

Alma Mater Studiorum - Università degli Studi di Bologna

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Dipartimento di Medicina Clinica Specialistica e Sperimentale
Sezione di Microbiologia

**DOTTORATO DI RICERCA IN BIOTECNOLOGIE MEDICHE
XIX CICLO**

TESI DI DOTTORATO

**ANALISI FUNZIONALE DI CLONI GENOMICI E
SUBGENOMICI DI PARVOVIRUS B19**

Coordinatore e Relatore
Prof.ssa MARIALUISA ZERBINI

Presentata da
Dott.ssa CLAUDIA FILIPPONE

Anno Accademico 2005-2006

Parvovirus B19	5
Introduzione	6
Tassonomia	7
Struttura e funzionalità virale.....	9
Organizzazione del genoma virale.....	9
Replicazione del genoma virale	10
Espressione del genoma virale.....	11
Mappa di trascrizione.....	11
Regolazione dell'espressione genica	13
Proteine virali.....	14
Proteina non-strutturale.....	15
Proteine capsidiche	15
Virione	16
Variabilità genetica	17
Varianti genotipiche.....	19
Interazione virus-cellula.....	22
Infettività.....	22
Ciclo virale.....	23
Recettore	23
Co-recettore.....	25
Eventi intracellulari.....	26
Epidemiologia	27
Prevalenza	27
Trasmissione	27
Manifestazioni cliniche.....	28
Infezione sperimentale.....	28
Infezione asintomatica	29
Eritema infettivo	29
Sindrome poliartropatica.....	30
B19 e artrite reumatoide.....	30
Crisi aplastica.....	31
Neutropenia, trombocitopenia e pancitopenia	32
Disordine midollare cronico.....	32
Sindromi immunodeficitarie congenite.....	32

Disordini linfoproliferativi.....	33
Sindrome da immunodeficienza acquisita	34
Pazienti trapiantati.....	34
Altri pazienti immunocompromessi.....	35
Idrope fetale	35
Disordini neurologici	36
Miocarditi.....	36
Epatiti.....	36
Infezioni persistenti.....	36
Trattamento e sviluppo di vaccini.....	38
Modelli animali	39
Risposta immunitaria all'infezione da parvovirus B19.....	40
Risposta immunitaria normale	40
Risposta immunitaria cellulare.....	41
Epitopi virali neutralizzanti.....	41
Principi diagnostici	43
Diagnosi virologica	43
Ricerca del DNA virale.....	43
Ibridazione in situ.....	44
Reazione polimerasica a catena (PCR)	44
Ricerca degli antigeni virali	46
Diagnosi sierologia	46
Saggio immunoenzimatico (EIA)	46
Saggio di immunofluorescenza (IF).....	47
Saggio di Western Blot	47
Parte Sperimentale.....	48
Premessa e scopo del lavoro	49
Materiali e Metodi I - Generazione di cellule CD36 ⁺	53
Coltura cellulare.....	53
Analisi FACS	54
Saggio di infezione.....	54
Analisi del DNA.....	54
Analisi dell'RNA	55
Analisi delle proteine	56

Trasfezione.....	57
Materiali e Metodi II- Analisi cloni genomici e subgenomici	58
DNA.....	58
Cloni genomici di Parvovirus B19.....	58
Cloni subgenomici di Parvovirus B19	59
Costrutto sintetico - cclDNA.....	60
Cellule	62
Trasfezione.....	62
Preparazione lisato cellulare da cellule trasfettate	62
Infezione.....	63
Analisi dell'attività infettante dei cloni genomici.....	64
Analisi del DNA.....	64
Analisi dell'RNA	64
Espressione delle proteine.....	65
Analisi strutturale.....	66
Studio della regione VP1 unica.....	67
Analisi dell'attività fosfolipasica	69
Analisi di mutagenesi.....	70
Analisi quantitativa cloni genomici e subgenomici	72
Analisi delle proteine	72
Estrazione del DNA	73
Estrazione dell'RNA	73
Real Time PCR	73
Preparazione del bersaglio a DNA HR0	75
Real time RT-PCR	75
Quantificazione assoluta DNA.....	76
Quantificazione relativa RNA.....	76
Risultati I- Generazione di cellule CD36 ⁺	77
Coltura cellulare.....	77
Analisi FACS	78
Saggio di infezione.....	79
Analisi del DNA.....	79
Analisi dell'RNA	79
Analisi delle proteine	81

Trasfezione.....	82
Risultati II- Analisi cloni genomici e subgenomici	83
Analisi dell'attività infettante dei cloni genomici del B19	83
Analisi del DNA.....	83
Analisi dell'RNA	84
Espressione delle proteine.....	87
Analisi strutturale.....	88
Studio della regione VP1 unica.....	90
Analisi dell'attività fosfolipasica	92
Analisi di mutagenesi.....	93
Analisi quantitativa cloni genomici e subgenomici	94
Analisi elettroforetica.....	94
Analisi delle proteine	96
Real-time PCR	98
Bersaglio HR0 - Costruzione di retta standard	98
Quantificazione assoluta DNA.....	99
Quantificazione relativa RNA.....	99
Analisi DNA lisato.....	100
Analisi RNA lisato.....	101
Analisi DNA post-trasfezione.....	101
Analisi RNA post-trasfezione	102
Analisi DNA post-infezione.....	103
Analisi RNA post-infezione.....	103
Discussione	105
Bibliografia	115

Parvovirus B19

Introduzione

Il parvovirus B19 è sempre stato considerato l'unico parvovirus umano riconosciuto come patogeno per l'uomo. Esso fu scoperto nel 1974 in Inghilterra da Yvonne Cossart e collaboratori nel corso di test per valutare la presenza in campioni di siero dell'antigene di superficie del virus dell'epatite B [Cossart et al., 1975].

Alcuni sieri (fra cui un campione codificato come B19) diedero risultati anomali, risultando positivi alla contro-immunoelettroforesi ma negativi ai più sensibili saggi di emagglutinazione passiva e radioimmunologico. Il precipitato formato fra siero umano iperimmune e siero in esame per la presenza di antigene virale fu esaminato in microscopia elettronica, dimostrando la presenza di particelle di dimensioni attorno ai 23 nm, con le caratteristiche morfologiche dei parvovirus. In assenza di reattività antigenica crociata con i parvovirus Adeno-Associati o con i parvovirus animali questi virus furono identificati come "Serum parvovirus-like Virus" (SPLV). L'analisi delle caratteristiche molecolari e genetiche dell' SPLV hanno permesso di classificare definitivamente questo virus nella famiglia Parvoviridae; la nomenclatura raccomandata nel 1985 dall'ICTV è parvovirus B19, dal codice di uno dei primi sieri viremici identificati.

I primi isolati provenivano da campioni di siero di donatori di sangue completamente asintomatici. Un primo caso di infezione sintomatica fu associato ad una breve malattia febbrile [Shneerson et al., 1980]. La prima malattia clinicamente significativa associata all'infezione da parvovirus B19 è stata la crisi aplastica in pazienti con anemia a cellule falciformi [Pattison et al., 1981]; successivamente lo sviluppo di tecniche per la ricerca di anticorpi nei confronti del virus ha permesso di dimostrare una correlazione eziologica fra infezione da B19 ed eritema infettivo (quinta malattia) [Anderson et al., 1983].

Le conoscenze attuali riconoscono il parvovirus B19 come implicato in una serie di situazioni patologiche che vanno dall'eritema infettivo ad artropatie, ad alterazioni ematologiche di tipo acuto o cronico, fino ad alterazioni fetali in caso di trasmissione transplacentare. La patogenesi è strettamente collegata al tropismo virale per i tessuti emopoietici e fetali, tropismo che è dovuto all'interazione fra caratteristiche genetiche e molecolari del virus e caratteristiche strutturali e funzionali delle cellule.

Tassonomia

Tutti i virus classificati nella famiglia *Parvoviridae*, in base a criteri strutturali e funzionali [Fauquet et al., 2001], sono particelle virali prive di involucro lipidico, costituite da un capsidico a morfologia icosaedrica (20-25 nm di diametro), e contenenti un'unica molecola di DNA monocatenario di circa 5000 nucleotidi. La famiglia è attualmente divisa in due sottofamiglie: i virus degli insetti sono classificati nella sottofamiglia *Densovirinae*, mentre i virus dei vertebrati sono riuniti nella sottofamiglia *Parvovirinae*. All'interno di questa sottofamiglia, in base a diverse caratteristiche funzionali, sono distinti i tre diversi generi: Parvovirus, Erythrovirus, Dependovirus. Il parvovirus B19 appartiene al genere Erythrovirus.

La diversità genetica tra isolati di virus B19 è sempre stata considerata molto bassa, con meno dell'1-2% di divergenza nucleotidica nell'intero genoma; recentemente però è stato riportato l'isolamento da un bambino con anemia aplastica transitoria di un nuovo Erythrovirus umano, geneticamente distinto, denominato V9 [Nguyen et al., 1999; Nguyen et al., 1998]. La variabilità genetica si estende lungo l'intero genoma con più del 12% di divergenza nucleotidica tra B19 e V9. Uno studio condotto in Francia tra il 1999 e il 2001 ha portato all'isolamento di 11 diversi virus correlati a V9 e ha mostrato che questi virus circolano ad una frequenza significativa (11.4%) insieme ai virus B19-simili [Servant et al., 2002].

Studi recenti hanno poi dimostrato l'esistenza di un ulteriore nuovo genotipo virale (a cui appartengono gli isolati LaLi e A6) che differisce ampiamente dal genotipo classico di B19 e che, per l'isolato LaLi, è presente in forma persistente a livello della cute umana: analisi di sequenza hanno dimostrato che questo nuovo virus presenta, a livello della sequenza codificante, una variabilità genetica del 10.8% rispetto alla sequenza di riferimento del B19 e dell'8.6% rispetto alla variante V9, mentre la divergenza a livello della regione non codificante risulta pari al 26.5 e 17.2% rispettivamente [Hokynar et al., 2002; Nguyen et al., 2002].

Le analisi filogenetiche delle sequenze disponibili in GenBank indicano che il gruppo degli eritrovirus umani è verosimilmente più complesso di quanto ipotizzato precedentemente e potrebbe essere diviso in 3 ben caratterizzati genotipi. I virus *B19-correlati* corrispondono al genotipo 1, le forme *LaLi* e *A6* appartengono al genotipo 2 e i virus *V9-correlati* (come D91.1) costituiscono il genotipo 3.

L'importanza di questi nuovi genotipi, in termini di patogenicità e di proprietà antigeniche, resta però ancora da stabilire e numerosi studi stanno muovendo in questa direzione.

Genere	specie	ospite naturale
Parvovirus	H-1 Virus	Roditori
	LuIII Virus	Roditori
	Minute Virus of Mice	Topo, ratto
	Bovine parvovirus	Bovini
	Porcine parvovirus	Maiale
	Feline parvovirus e varianti d'ospite	Gatto
	Feline Panleukopenia Virus	Gatto
	Canine parvovirus	Cane
	Mink Enteritis Virus	Visone
	Aleutian Mink Disease Virus	Visone, furetto, procione
Erythrovirus	Human parvovirus B19	Uomo
	<i>Genotype 1 (B19)</i>	
	<i>Genotype 2 (Lali, A6)</i>	
	<i>Genotype 3 (V9, D91.1)</i>	
	Chipmunk parvovirus	Roditori
	Simian parvovirus	Macaca Fascicularis
Dependovirus	Pig-tailed macaque parvovirus	Macaca Nemestrina
	Rhesus parvovirus	Macaca Mulatta
	Adeno-Associated Virus type 1	Uomo
	Adeno-Associated Virus type 2	Uomo
Dependovirus	Adeno-Associated Virus type 3	Uomo
	Adeno-Associated Virus type 4	Uomo
	Adeno-Associated Virus type 5	Uomo
	Adeno-Associated Virus type 6	Uomo
	Adeno-Associated Virus type 7	Uomo
	Adeno-Associated Virus type 8	Uomo
	Bovine Adeno-Associated Virus	Bovini
	Canine Adeno-Associated Virus	Cane
	Equine Adeno-Associated Virus	Cavallo
	Ovine Adeno-Associated Virus	Ovini
	Avian Adeno-Associated Virus	Uccelli

Classificazione corrente della famiglia Parvoviridae, sottofamiglia Parvovirinae

Struttura e funzionalità virale

Organizzazione del genoma virale

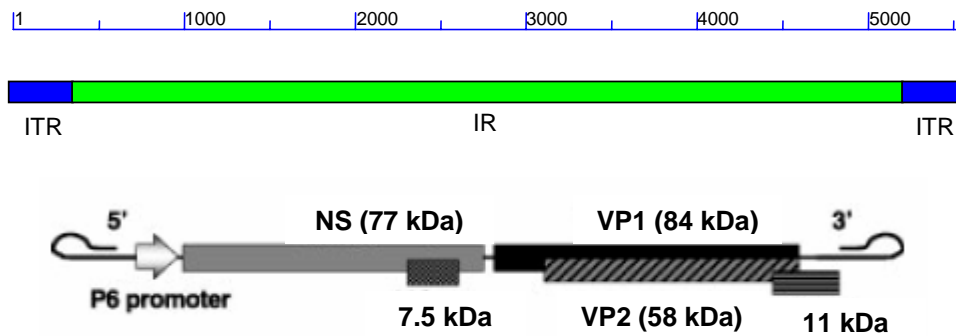
La caratterizzazione del genoma del parvovirus B19 è stata inizialmente ottenuta analizzando DNA virale purificato da virus isolato da siero [Clewley, 1984; Summers et al., 1983]. Il virus può essere purificato dal siero mediante ultracentrifugazione su cuscino di saccarosio. La lisi dei virioni e la successiva purificazione del DNA virale mediante estrazione con fenolo-cloroformio producono una molecola di DNA a doppia catena di dimensioni superiori a 5 kbp, facilmente separabile nelle due catene singole mediante trattamento a 70°C o con alcali. La purificazione del DNA virale in condizioni tali da prevenire la riassociazione delle catene produce invece molecole a singola catena in grado di riassociarsi *in vitro* nella forma a doppia catena.

Il genoma del parvovirus B19 consiste quindi di un'unica molecola lineare di DNA monocatenario; molecole di opposta polarità sono incapsidate separatamente con uguale frequenza. La clonazione molecolare del genoma del parvovirus B19, effettuata per la prima volta nel 1984, ha in seguito consentito di ottenere la sequenza nucleotidica completa e di analizzare l'organizzazione genomica del DNA virale, partendo da due differenti isolati virali: Wi dall'Inghilterra e Au dagli USA [Cotmore, Tattersall, 1984; Deiss et al., 1990, Shade et al., 1986].

L'intera molecola è lunga 5596 nt.; sequenze terminali in ripetizione invertita di 383 nt. fiancheggiano una sequenza interna unica di 4830 nt., contenente l'intera regione codificante del B19. I 365 nt. distali nelle sequenze terminali contengono un asse di simmetria e formano un palindromo imperfetto, che può essere presente in due diversi arrangiamenti (denominati flip/flop), essendo ciascuno il complemento inverso dell'altro. Queste sequenze sono in grado di ripiegarsi su se stesse in un segmento bicatenario a forcina (hairpin); strutture terminali a forcina sono state osservate direttamente in microscopia elettronica [Mori et al., 1987; Zuccheri et al., 2001]. Tutto ciò fu successivamente confermato tramite clonazione e successivo sequenziamento di un ulteriore e differente isolato virale, Stu [Hicks et al., 1996], a partire dalla regione interna ed estendendosi ai terminali. Infine è stato più recentemente ottenuto un clone contenente l'intero genoma B19 dall'isolato HV, la cui sequenza completa si estende per tutto il genoma, compresi i terminali. [Gallinella, Venturoli, 1999], ed è stato inserito nel database NCBI.

L'organizzazione genomica del parvovirus B19 ricorda quindi quella dei parvovirus Adeno-Associati [Bern, Bohenzky, 1987]; in entrambi i casi sono presenti molecole di DNA di entrambe le polarità, incapsidate con uguale frequenza; in entrambi i casi una sequenza interna unica codificante è fiancheggiata da ripetizioni terminali che possono assumere una struttura secondaria complessa. I termini del B19 sono però di dimensioni maggiori dei termini dei virus Adeno-Associati, mentre in questi ultimi essi assumono una conformazione più complessa. Nei parvovirus animali invece sono

di solito presenti con maggior frequenza le catene di polarità negativa (anti-messaggero), e i termini sono differenti fra di loro per sequenza e conformazione [Cotmore, Tattersall, 1987].



Organizzazione del genoma di parvovirus B19

Replicazione del genoma virale

Il modello corrente per descrivere la replicazione del DNA di parvovirus B19 si basa sul modello di Cavalier-Smith, originariamente proposto per spiegare la replicazione di molecole lineari di DNA cromosomico e successivamente adottato per i genomi dei parvovirus Adeno-Associati [Berns, Bohenzky, 1987]. Il modello prevede che strutture terminali a forcina fungano da innesco per la sintesi di catene complementari alla catena originale, trasformando così una molecola a catena singola in una molecola a catena doppia, che la catena originale venga poi tagliata in un punto opposto all'origine della sintesi, e che infine venga completato il duplex nella regione rimasta a filamento singolo, ricostituendo così il termine originale.

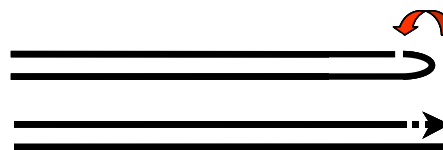
Tale modello comporta l'esistenza di forme replicative intermedie caratteristiche, che possono essere identificate a conferma della validità del modello stesso. In particolare, devono esistere molecole a doppia catena in cui una delle estremità sia costituita da un'ansa continua. Nel DNA di B19, entrambe le strutture a forcina terminali possono fungere da innesco per la sintesi delle catene complementari di DNA. *In vitro* [Cotmore, Tattersall, 1984], la DNA Polimerasi I di E.Coli può estendere la forcina terminale a partire dall'estremo 3' su entrambe le catene, convertendo il DNA virale a singola catena in una forma a doppia catena con peso molecolare superiore a 5 kbp.

Il clivaggio di questa molecola con l'endonucleasi di restrizione *Bam*HI (che taglia la molecola in un sito unico) produce due doppietti di bande in quantità equimolare, di 3.8-3.9 e 1.4-1.5 kbp rispettivamente. Per entrambi questi doppietti, la banda a peso molecolare inferiore corrisponde al frammento terminale di innesco della sintesi, in cui la molecola di DNA forma un'ansa continua (forma "turn-around"); la banda a peso molecolare superiore corrisponde al frammento terminale opposto, in cui la molecola di DNA è completamente estesa in forma a doppia catena (forma "extended").

Conversione del genoma parentale in molecola bicatenaria



Risoluzione ed estensione dei termini operata dalla proteina NS



Separazione dei prodotti della replicazione



Mappa molecolare per la replicazione del genoma di parvovirus B19

L'infezione *in vitro* di colture di cellule di midollo osseo ha permesso di confermare questo modello [Ozawa et al.,1986]. Il DNA di B19 è stato evidenziato a livello nucleare ed è stato caratterizzato per la presenza delle forme replicative; è costantemente presente una forma a doppia catena di 5.6 kbp, che in seguito a clivaggio con *BamHI* produce i caratteristici doppietti a 3.8-3.9 e 1.4-1.5 kbp. Effettuando un trattamento di denaturazione e rinaturazione rapida del DNA virale si ha una denaturazione specifica delle forme "extended", mentre le forme "turn-around" si ricostituiscono ("snap-back"), confermando così che si tratta di forme in cui un estremo è costituito da un filamento continuo di DNA. Analizzando il DNA virale presente a livello citoplasmatico, oppure purificato dal virus presente nel soprannatante, sono identificabili invece solo le forme a catena singola o a catena doppia derivate dalla riassociazione in soluzione durante il processo di purificazione (differenziabili perché non producono doppietti al clivaggio enzimatico e non vanno incontro a "snap-back"); queste non sono forme replicative e costituiscono invece i prodotti della replicazione del DNA virale.

Espressione del genoma virale

Mappa di trascrizione

L'organizzazione genomica del parvovirus B19 è stata inizialmente suggerita dall'analisi di sequenza del DNA clonato [Shade et al., 1986] ed è risultata analoga a quella degli altri parvovirus dei vertebrati. Solo una delle due catene di DNA (indicata a polarità positiva) possiede moduli di lettura aperti in grado di codificare per proteine; la parte sinistra del genoma codifica per le proteine non-strutturali, mentre la parte destra codifica per le proteine capsidiche.

In seguito, la mappa di trascrizione è stata determinata con precisione in base all'analisi dei mRNA virali in cellule di midollo infettate con B19, ed è risultata unica fra i parvovirus conosciuti [Ozawa

et al., 1987]. Esistono nove trascritti poliadenilati. Ciascuno inizia con la medesima sequenza leader (nt 351), guidata da un singolo promotore in posizione 6 u.m. (P₆). Di questi trascritti, tre terminano a metà del genoma, in corrispondenza di segnali di poliadenilazione insoliti (nt 2639/2645); fra questi il messaggero da 2.3 kb è l'unico che non subisce processi di splicing, mentre l'escissione di un introne (nt 406-1910/2030) produce 2 messaggeri da 0.7-0.8 kb, estremamente abbondanti. I rimanenti sei messaggeri terminano all'estremità destra del genoma, in corrispondenza di un sito canonico di poliadenilazione (nt.4990), e sono tutti rimaneggiati per rimozione di uno o due differenti introni. La rimozione del primo introne (nt 406-1910/2030) è comune per tutti i messaggeri, producendo una molecola da 3.1 kb; la rimozione di un secondo introne (nt 2183-3045) produce un messaggero da 2.2 kb, mentre la successiva rimozione di un secondo diverso introne (nt 2183-4704) produce messaggeri da 0.5-0.6 kb, ancora estremamente abbondanti.

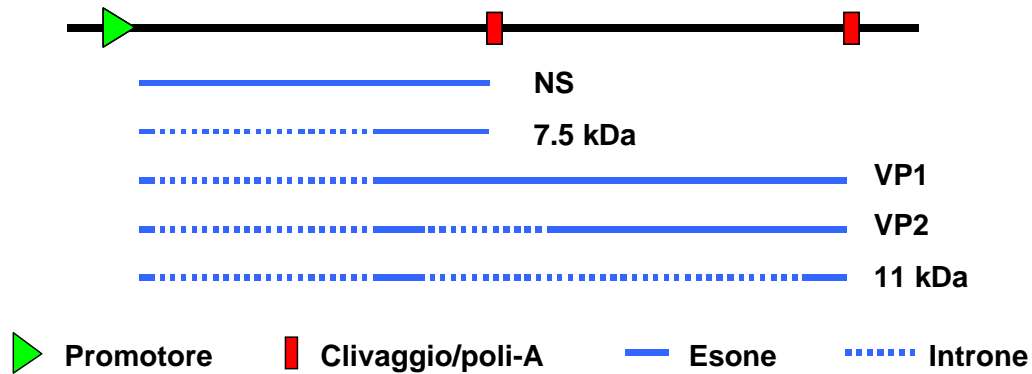
La mappatura funzionale [Ozawa et al., 1988] è stata ottenuta mediante traduzione *in vitro* dopo selezione negativa dei messaggeri virali. Oligonucleotidi antisenso corrispondenti a diverse porzioni del genoma sono stati ibridati *in vitro* a RNA purificato da cellule di midollo infettate da B19; gli ibridi RNA-Oligo sono quindi stati degradati mediante RNasi H. I campioni di RNA sono poi stati utilizzati in sistemi di sintesi proteica *in vitro*, e le proteine virus-specifiche prodotte identificate mediante immunoprecipitazione. Questi studi hanno confermato che il messaggero da 2.3 kb codifica per la proteina non-strutturale (NS), mentre i messaggeri da 3.1 e 2.2 kb codificano per le proteine capsidiche (VP1 e VP2 rispettivamente).

La trascrizione del B19 è stata studiata utilizzando sistemi ibridi B19-SV40 espressi transitoriamente in cellule COS-7 [Beard et al., 1989]. Molecole chimeriche contenenti l'origine replicativa del virus SV40 possono replicarsi transitoriamente ma con elevata efficienza in cellule COS-7, consentendo così l'espressione di sequenze eterologhe. L'espressione di sequenze di B19 in questi vettori ha prodotto molecole di RNA e proteine indistinguibili dalle molecole autentiche, sia per la proteina non-strutturale sia per le proteine capsidiche. È da notare che l'espressione della proteina non-strutturale consente la replicazione di questi vettori a livello 10 volte inferiore rispetto a vettori in cui quest'espressione sia assente (es., per introduzione di una mutazione).

Infine, librerie genomiche da cDNA virale sono state allestite sia dal sistema in cellule COS-7, sia da cellule eritroleucemiche infettate con B19 [St Amand et al., 1991]. Queste librerie sono state utilizzate per la precisa mappatura e lo studio dell'espressione dei messaggeri a basso peso molecolare da 0.7-0.8 e 0.5-0.6 kb. In sistemi *in vitro* [St Amand, Astell, 1993], si è visto come i messaggeri da 0.5-0.6 kb dirigano la sintesi di una famiglia di molecole proteiche con peso molecolare attorno a 11 kDa (la variabilità dipende dall'utilizzo di segnali di inizio alternativi), evidenziabili anche nei lisati di cellule infettate da B19 e localizzate mediante immunofluorescenza

nel nucleo e citoplasma delle cellule infette. La funzione di questa famiglia di proteine è allo stato attuale non conosciuta.

Inoltre, si è visto che il modulo di lettura fra i nt 1910-2128, presente sia nei messaggeri da 0.8 kb, sia in quelli da 0.6 kb, è in grado di codificare per una proteina da 7 kDa; questa proteina è anch'essa espressa in cellule infettate da B19 ed è presente in nucleo e citoplasma [Luo, Astell, 1993]. Anche in questo caso la funzione di questa molecola non è conosciuta.



Mappa di trascrizione del parvovirus B19

Regolazione dell'espressione genica

La regolazione dell'espressione genica del B19 avviene a livello di inizio della trascrizione e a livello post-trascrizionale, e dipende essenzialmente da tre elementi: (a) il promotore della trascrizione, con le sequenze regolative connesse; (b) i segnali di clivaggio e poliadenilazione dei messaggeri virali; (c) i segnali di splicing dei messaggeri virali.

Esiste un unico elemento promotore, situato a 6 u.m. (P_6), in grado di dirigere la sintesi di tutti i trascritti virali; infatti, tutti i messaggeri virali iniziano nel medesimo sito in posizione nt 351. Il promotore è stato caratterizzato funzionalmente *in vitro* mediante esperimenti di "run-off", in cui un segmento compreso fra i nt 100-350 era in grado di dirigere la sintesi di mRNA virale [Blundell et al., 1987; Doerig et al., 1987]. Lo stesso segmento è in grado di dirigere l'espressione di geni eterologhi reporter (CAT o luciferasi) in plasmidi chimerici transfettati in cellule eucariotiche. L'attività di questo promotore dipende da un sito canonico di riconoscimento per il fattore di trascrizione TFIID (TATA box) e da una regione a monte ricca di siti di riconoscimento per fattori di trascrizione cellulari; fra questi, i siti (GC boxes) di riconoscimento per il fattore Sp1 sono stati riconosciuti necessari per l'attività del promotore [Blundell et al., 1987; Liu et al., 1991]. È stato visto come l'attività di questo promotore non sia di per sé specifica per un determinato tipo cellulare (in particolare per i precursori eritroidi), ma abbia invece livelli comparabili di attività in cellule permissive oppure non-permissive per la replicazione virale [Liu et al., 1991]. Inoltre, sebbene la proteina non-strutturale possa avere un effetto di attivazione sul promotore stesso, innescando un

feedback positivo [Doerig et al., 1990], non è stato identificato nessun altro elemento promotore virale trans-attivabile possibilmente soggetto a regolazione trascrizionale. E' verosimile quindi che l'attività del promotore P₆ sia costitutiva, dipendente da fattori trascrizionali cellulari comuni, e che la regolazione dell'espressione genica avvenga quindi a livello post-trascrizionale.

Recentemente è stata studiata l'attività del promotore P₆ e sono stati caratterizzati gli elementi regolatori del promotore clonando l'intera sequenza di P₆ e diversi subframmenti in vettori di espressione a monte di un gene reporter codificante per la luciferasi [Gareus et al., 1998]. I vettori ricombinanti sono stati poi trasfettati in diverse linee cellulari (epiteliali, eritroleucemiche, linfociti B e T) per studiare l'attività trascrizionale di P₆. Da tale studio è emerso che gli elementi indispensabili per l'attività del promotore sono localizzati nelle regioni comprese tra i nt 100 e 190 e tra i nt 233 e 298 di P₆. Inoltre trasfettando il vettore di espressione contenente la sequenza P₆ in cellule HeLa che portano stabilmente il gene codificante per l'NS sotto controllo di un promotore inducibile, è stato notato un aumento dell'attività trascrizionale mediata da P₆ in seguito all'induzione dell'espressione di NS. La regione compresa tra il nt 100 ed il 160 di P₆ è risultata essenziale per l'azione transattivante di NS come essenziale è risultata la presenza di due elementi ricchi in GC arrangiati in tandem a monte del TATA box. Questi dati indicano che la transattivazione di P₆ mediata da NS è dipendente dalla combinazione di molti fattori che comprendono la proteina NS stessa ma anche la presenza di siti di legame per fattori cellulari (ATF, NFkB/c-Rel e GC-box, Ets) [Raab et al., 2001; Raab et al., 2002; Vassias et al., 1998]. Il bilancio fra i messaggeri per la proteina non-strutturale e i messaggeri per le proteine capsidiche è regolato dal diverso utilizzo di due distinti segnali di clivaggio e poliadenilazione nei precursori dei messaggeri virali [Liu et al., 1992]. Un segnale di sequenza insolita è situato internamente nel genoma (nt 2639); questo elemento è utilizzato nella produzione di messaggeri di 2.3 kb, che codificano per la proteina non-strutturale; successivamente si può avere la rimozione dell'introne fra i nt 406-1910/2030, con produzione dei messaggeri da 0.5-0.6 kb. Un segnale di sequenza canonica è situato all'estremità del genoma (nt 4990); questo elemento è utilizzato nella maturazione dei messaggeri che codificano per le proteine capsidiche. Si ha costantemente la rimozione del primo introne, con produzione di messaggeri di 3.1 kb in grado di codificare per la proteina VP1 e che per ulteriori processi di splicing, con rimozione di uno di due distinti introni (nt 2183-3045 o nt 2183-4704), possono dare origine ai messaggeri di 2.2 kb per la proteina capsidica VP2 o ai messaggeri di 0.7-0.8 kb in grado di codificare per la famiglia di proteine da 11 kDa. La regolazione dell'espressione genica avviene principalmente a livello post-trascrizionale.

Proteine virali

Proteina non-strutturale

La proteina non-strutturale del parvovirus B19 (NS) è codificata dalla sequenza compresa fra i nt 435-2448, ed è trascritta dal mRNA di 2.3 kb; la proteina è composta da 671 aminoacidi. In colture di cellule di midollo infettate con B19 sono state identificate all'immunoprecipitazione una proteina di 77 kDa e due forme minori di 52 kDa e 34 kDa, probabilmente prodotti di degradazione proteolitica. All'immunoblotting queste proteine sono state rintracciate esclusivamente nella frazione nucleare, essendo invece assenti nel citoplasma, nel sovrinatante della coltura e nei virioni purificati [Ozawa, Young, 1987].

Il gene per le proteine non-strutturali è moderatamente conservato nei parvovirus, in relazione al ruolo che le proteine NS hanno nel ciclo virale. Queste sono proteine a localizzazione nucleare, con capacità di legarsi al DNA, caratterizzate da attività nucleasica ed elicastica. Sono necessarie per la replicazione del DNA virale, operando la risoluzione delle strutture terminali a forcina negli intermedi replicativi; possono essere coinvolte nella regolazione trascrizionale, operando come attivatori o inibitori; possono essere coinvolte nella incapsidazione del DNA virale. Esse interagiscono inoltre con le funzioni cellulari, potendo avere attività su promotori cellulari eterologhi, effetto citotossico od oncosoppressivo.

La proteina NS del B19 possiede caratteristiche di localizzazione nucleare, mediata da segnali specifici di trasporto nucleare, e di legame al DNA, nonché attività nucleasica ed elicastica. Questo indica la proteina come effettrice della risoluzione terminale nel processo di replicazione del DNA virale. A livello aminoacidico, essa conserva una regione comune alle proteine non-strutturali di altri parvovirus e presente anche negli antigeni T dei Polyomavirus, caratterizzata da due siti di fosforilazione e un sito di legame nucleotidico ed essenziale per l'attività della proteina. La proteina NS è inoltre mediatrice della citotossicità del virus [Ozawa et al., 1988].

Proteine capsidiche

Le proteine strutturali VP1 e VP2 sono codificate dalla sequenza compresa fra i nt 2444-4786 e 3125-4786 rispettivamente, e sono trascritte dai messaggeri di 3.1 e 2.2 kb. Le due proteine sono quindi codificate in maniera sovrapposta nella metà destra del genoma; la proteina VP1 è costituita da 781 aminoacidi, di cui i 554 aminoacidi terminali sono comuni alla proteina VP2, mentre i primi 227 sono codificati dalla regione sinistra della sequenza, definita come VP1 unica (VP1u). Le proteine capsidiche sono state analizzate mediante elettroforesi, immunoprecipitazione ed immunoblotting in colture di cellule di midollo infette [Ozawa, Young, 1987]. Le proteine VP1 e VP2 sono state identificate come 84 kDa e 58 kDa rispettivamente; la proteina VP2 è maggiormente

rappresentata, costituendo circa il 95% delle proteine capsidiche e fino al 5% delle proteine cellulari totali.

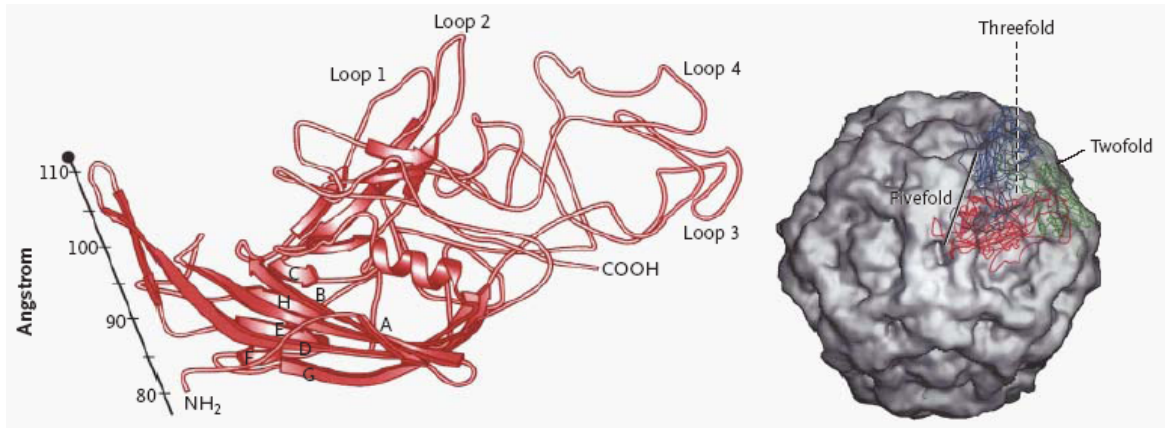
La differenza nell'abbondanza delle proteine capsidiche dipende da una regolazione a livello di inizio della sintesi proteica. La presenza nel messaggero per VP1 di multipli codoni di inizio fuori modulo a monte del codone effettivo di inizio riduce l'efficienza della sintesi proteica. Nel messaggero per VP2 queste sequenze sono eliminate dai processi di splicing, cosicché l'efficienza di sintesi proteica torna ad essere massimale [Ozawa et al., 1988].

Virione

Il virione del B19 è un icosaedro costituito da 60 unità proteiche. È per la maggior parte composto da VP2, con solo il 5-10% di proteina VP1. La struttura atomica è risolta al livello cristallografico di 8Å, suggerendo una disposizione analoga a quella di altri parvovirus [Agbandje et al., 1994]; ciascuna unità capsomerica ha una struttura di base con 8 fogli β -planari, che costituisce il nucleo centrale del capside, fra cui si interpongono anse che contribuiscono alla definizione della superficie esterna del virione.

Utilizzando tecniche di ingegneria genetica si è ottenuto l'espressione delle proteine capsidiche in cellule eucariotiche; in particolare, il sistema di espressione in cellule di insetto utilizzando vettori derivati da Baculovirus ha consentito l'ottenimento di rese elevate di proteine virali [Brown et al., 1991; Kajigaya et al., 1991]. In questi sistemi le proteine virali possono assemblarsi anche in assenza del genoma virale dando origine a capsidi morfologicamente ed antigenicamente simili ai virioni originali.

Nel sistema in Baculovirus, l'espressione della proteina VP2 da sola è sufficiente per la formazione di capsidi morfologicamente regolari. La proteina VP1 da sola non è in grado di formare capsidi, ma piuttosto strutture irregolari; forme progressivamente troncate di VP1 tornano man mano a formare capsidi regolari. Il rapporto fra VP1 e VP2 appare fisso nei virioni autentici, ma sperimentalmente è possibile arricchire i virioni in VP1 rispetto alla VP2. La localizzazione delle sequenze uniche di VP1 è esterna al capside, anche se non è ancora definita strutturalmente; la presenza di VP1 contribuisce inoltre ad alterare la conformazione di VP2 [Rosenfeld et al., 1992; Wong et al., 1994].



Struttura tridimensionale della proteina capsidica VP1 e del virione

Variabilità genetica

Da uno studio di allineamento globale, eseguito su 16 sequenze complete di isolati di virus B19 presenti nel data base NCBI [Gallinella et al., 2003] e concentrato sulla regione interna di 4830 del genoma di B19, sono state identificate 216 posizioni variabili: di queste, 69 sono presenti in più di un isolato (in genere tra due e otto) mentre 147 si rinvencono solo in singoli isolati; in particolare, 208 di questi polimorfismi implicano solo due differenti basi, a differenza delle restanti 8 posizioni che ammettono più basi.

NCBI	Ref.	Isolato	<i>Origine</i>	<i>Campione</i>	Variabilità (nt)	Variabilità (%)
NC_000883	1	HV	Inghilterra, 1990	Siero	28/4830	0.58
M24682	2	Wi	Inghilterra, 1973	Siero	27/4830	0.56
M13178	3	Au	USA, 1982	Siero	16/4830	0.33
Z68146	4	Stu	Inghilterra, 1993	Siero	19/4830	0.39
Z70528	5	2/II	Germania, 1994	Siero	23/4578	0.50
Z70560	5	I/1	Germania, 1994	Siero	13/4621	0.28
Z70599	5	SP2	Germania, 1994	Siero	28/4514	0.62
AF113323	6	SLE	Germania, 1997	Siero	31/4538	0.68
AB030673	7	N8	Giappone, 1987	Siero	11/4628	0.24
AB030693	7	Mi	Giappone, 1999	Midollo Osseo	10/4663	0.21
AB030694	7	Rm	Giappone, 1999	Midollo Osseo	35/4663	0.75
AF161223	8	Kati 1	Finlandia, 1999	Sinovia	27/4265	0.63
AF161224	8	Kati 2	Finlandia, 1999	Sinovia	22/4265	0.52
AF161225	8	Kati 3	Finlandia, 1999	Sinovia	29/4268	0.68
AF161226	8	Kati 4	Finlandia, 1999	Sinovia	23/4279	0.54
AY028237	9	E.1.1	Svezia, 2001	Siero	21/4513	0.47

Sequenze impiegate nello studio di allineamento globale

Dall'analisi del gruppo di isolati Kati1-4, ottenuti da sinovie in infezioni sia croniche che acute, è evidenziata una variabilità rientrante nella media che non presuppone a una specificità tissutale di queste varianti. Questi dati indicano pertanto che, rispetto alla sequenza di consenso HV, ogni isolato mostra uno stretto range di variabilità, compresa tra lo 0.21 e 0.75% (da 10 a 35 basi per isolato).

Allineamenti parziali effettuati a livello della regione del Promotore, della NS e della VP (comprendente la VP1u e la VP1/VP2 comune) hanno poi evidenziato aspetti molto interessanti:

1. La regione del Promotore risulta essere quella più liberamente variabile. Sono state riportate divergenze intorno allo 0.3% [Gareus et al., 1998] e oltre il 4% [Zakrzewska et al., 2001], senza osservare alterazioni delle sue caratteristiche funzionali.
2. La regione NS mostra solo una debole variabilità. Probabilmente questo può implicare una variazione delle caratteristiche funzionali della proteina Non Strutturale, con possibili conseguenze sulla biologia virus; in particolare [Hemanuer et al., 1996] sembra possa essere

importante la sostituzione della Cys 508 della proteina NS, da un punto di vista di persistenza dell'infezione e risposta immunitaria, anche se tuttavia le maggiori sostituzioni si osservano nella regione compresa tra gli aa 181 e 192 [Ishii et al., 1999].

3. Nella regione VP1u si riescono ad identificare due distinti domini: il primo mostra elevata variabilità e corrisponde alla regione che codifica per numerosi epitopi lineari neutralizzanti; il secondo è conservato e corrisponde al dominio della fosfolipasi virale (nt 3150-3327), essenziale per l'infettività del virus [Gallinella et al., 2003].
4. La regione VP1/2 invece mostra una variabilità nettamente inferiore ed estremamente omogenea.

Varianti genotipiche

Nel 1999 è stata riportata l'identificazione di un isolato virale [Nguyen et al., 1999], ritrovato nel siero di un bambino di 8 anni affetto da anemia aplastica associata a deficit di G6PDH, geneticamente distinto dal B19 e denominato V9. La variabilità dell'isolato V9 si estende lungo l'intero genoma, con una divergenza superiore al 12%, ma risulta particolarmente concentrata a livello di un segmento di 346 nt nella regione VP1u.

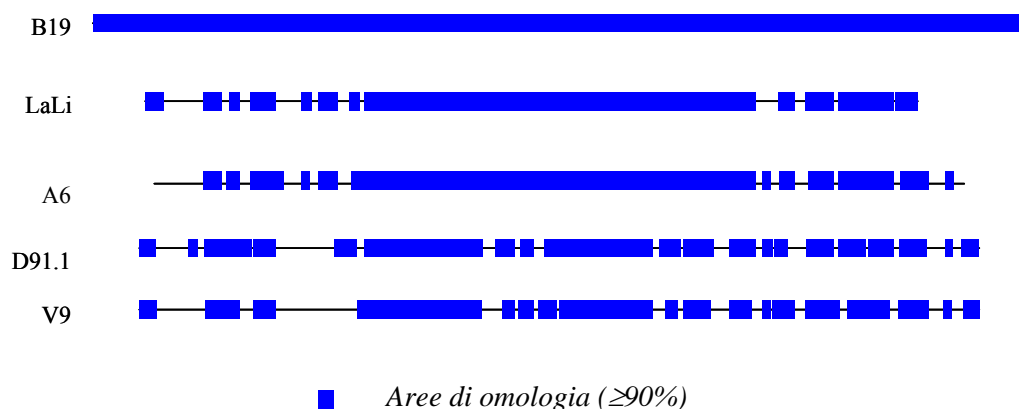
Nel 2002 [Hokynar et al., 2002], in seguito ad uno studio su campioni di cute umana effettuato su 34 pazienti finlandesi, due ulteriori varianti di Erythrovirus sono emerse, indicate col nome di LaLi e HaAM. Peraltro queste varianti hanno mostrato una persistenza a livello cutaneo, mentre non sono state rinvenute in campioni di midollo osseo e sinovie; ciò indica una correlazione tra genotipo virale e tropismo tissutale. Questi due isolati risultano differire tra loro di uno 0.3% in sequenza nucleotidica

Analisi filogenetiche e di allineamento con la sequenza di consenso di B19 hanno permesso di stabilire che:

1. A livello del Promotore le divergenze ammontano al 26.5% e per la massima parte sono rappresentate da delezioni;
2. Nella regione NS si osservano disomologie pari al 12.9% in nt e al 6% in aa;
3. Nella regione VP1u le differenze ammontano al 4.6% in nt e al 4.4% in aa, mentre nella VP1/2 comune si arriva al 12.9% in nt e all'1.1% in aa.

Lo studio condotto in Francia tra il 1999 e il 2001 [Servant et al., 2002] ha infine portato all'identificazione di 11 nuovi isolati varianti, recanti parametri di restrizione omologhi al virus V9 e perciò ad esso correlabili. Un clone ottenuto da questi, denominato D91.1, è stato sequenziato ed impiegato in studi filogenetici. Dal confronto degli isolati V9, D91.1, LaLi e HaAM con 12 sequenze di virus B19 presenti in NCBI è emerso che:

1. La massima disomologia è osservata a livello della regione del promotore p6, con divergenze oscillanti tra il 19.8 e il 25.7%;
2. I virus V9 e D91.1 sono più diversi tra loro (5.3%) che non i diversi isolati B19 (tra lo 0.2 e l'1.1%), dai quali distano per un 14% in sequenza nucleotidica;
3. Il virus LaLi mostra disomologie del 12% in nt dal virus B19 e del 9.3% dal virus V9.



Nello studio sopra riportato sono stati presi in esame più di 1084 campioni di siero suddivisi, in base di parametri epidemiologici e clinici, in 5 gruppi: 396 sono risultati positivi, di cui 385 hanno evidenziato parametri di restrizione del B19, mentre i restanti 11 parametri V9 simili. Il fatto che 9 di questi 11 isolati provengano da campioni Francesi, unitamente al mancato loro rinvenimento in altre zone, può far supporre che la loro circolazione sia limitata a questa area geografica, peraltro con una frequenza pari all'11.4%.

Gruppo	Quadro clinico	Provenienza
A	Pazienti HIV positivi	Francia, 1992 - 1997
B	Idropi fetali	Francia, 1995 - 1997
C	Gestanti con sintomi da infezione B19	USA
D	Pazienti B19 positivi	Francia, 1972 - 1999
E	Studio Prospettico	Francia, 1999 - 2001

Campioni di siero impiegati nello screening del 2002 in Francia [Servant et al., 2002]

Quasi contemporaneamente al precedente studio è stato riportato l'isolamento di una ulteriore variante di Erythrovirus umano, denominata A6, proveniente da un soggetto italiano HIV positivo affetto da anemia cronica [Nguyen et al., 2002]. Dal sequenziamento di due distinti cloni del virus A6 (omologhi per il 99.7% della sequenza nucleotidica) è stato possibile evidenziare un'omologia dell'87.8% con il virus B19 e del 92% con il virus V9, contro l'86.6% di omologia tra B19 e V9.

Un dato importante emerso è che le differenze tra virus A6 e B19 risultano essere meno marcate da un punto di vista di sequenza amminoacidica, piuttosto che nucleotidica: ciò indica che parte delle variazioni sono sinonime. L'isolato A6, sulla base della sequenza nucleotidica, può essere fatto rientrare all'interno del genotipo 2, unitamente agli isolati LaLi e HaAM.

Alla luce dei risultati ottenuti è stata quindi proposta una suddivisione degli Eytrovirus umani in tre ben distinti genotipi, sulla base sulle distanze genetiche evidenziate emerse: i virus *B19-correlati* corrispondono al genotipo 1, le forme *LaLi* e *A6* appartengono al genotipo 2 e i virus *V9-correlati* (come *D91.1*) costituiscono il genotipo 3.

L'elevato rapporto tra sostituzioni sinonime e non sinonime, emerso dall'analisi globale dei dati relativi a queste varianti, può far supporre che la separazione tra i diversi ceppi sia avvenuta in tempi lontani. La loro origine e rilevanza epidemiologica è al momento poco chiara, soprattutto perchè un numero limitato di studi fin ora è stato condotto in tal senso, e perchè le metodiche analitiche usate fino ad oggi non sono adeguate per la rivelazione e la caratterizzazione di varianti genotipiche di parvovirus B19.

Interazione virus-cellula

Il parvovirus B19 è funzionalmente autonomo, in quanto non richiede la contemporanea presenza di altri virus con funzioni helper; come tutti i parvovirus è però caratterizzato da una estesa dipendenza funzionale da fattori cellulari necessari per la completa espressione del genoma e per la replicazione virale.

Infettività

L'osservazione che l'infezione da parvovirus B19 in pazienti con anemie emolitiche croniche è associata ad un arresto dell'eritropoiesi suggerì che il principale bersaglio cellulare del virus potessero essere i precursori eritroidi. Successivi studi hanno confermato questa ipotesi e hanno condotto all'allestimento di sistemi cellulari *in vitro* per lo studio dell'infezione da B19.

Cellule di midollo osseo, coltivate su terreni semisolidi come la metilcellulosa, possono formare colonie isolate di derivazione dai precursori della serie eritroide (BFU-E e CFU-E), megacariocitaria (CFU-Meg) e granulo-monocitaria (CFU-GM). La preincubazione delle cellule con siero viremico portò ad una scomparsa della formazione di colonie eritroidi, lasciando inalterate le colonie di derivazione granulo-monocitaria. L'effetto di questa inibizione poté essere annullato dalla preincubazione del siero viremico con siero contenente anticorpi anti-B19 [Mortimer et al., 1983]. La selettiva scomparsa delle colonie eritroidi è attribuibile al tropismo e successivo effetto citotossico del virus; la presenza di anticorpi può neutralizzare l'infettività virale.

Cellule di midollo osseo coltivate in sospensione furono infettate con il parvovirus B19 [Ozawa et al., 1986; Ozawa et al., 1987]. In questo caso le forme replicative del DNA virale furono evidenziate mediante Southern blotting esclusivamente nella frazione eritroide, mentre non erano presenti nella frazione mieloide o linfocitaria. Le cellule infettate erano inoltre evidenziabili mediante ibridazione *in situ* per la ricerca degli acidi nucleici virali o mediante immunofluorescenza per la ricerca delle proteine capsidiche.

Precursori eritroidi di diversa provenienza coltivati *in vitro* sono utilizzati come sistemi cellulari permissivi per la replicazione del B19; il tessuto utilizzato prevalentemente è il midollo osseo [Ozawa et al., 1987; Srivastava, Lu, 1988], ma precursori infettabili sono presenti anche nel sangue periferico [Schwarz et al., 1992], nel sangue di cordone ombelicale [Srivastava et al., 1992] e nel fegato fetale [Brown et al., 1992; Yaegashi et al., 1989].

In tutti i sistemi esiste una richiesta assoluta di eritropoietina per mantenere lo stato di permissività. Le cellule staminali non sono infettate, mentre i principali bersagli sono cellule della linea eritroide maggiormente differenziate, come BFU-E, CFU-E ed eritroblasti [Takahashi et al., 1990]. Anche i

megacarioblasti sembrano essere interessati dall'infezione, subendo un effetto citotossico senza essere permissivi per la replicazione virale [Srivastava et al., 1990].

Le cellule infettate subiscono un caratteristico effetto citopatico [Morey et al., 1993; Young et al., 1984]. A 24 ore post-infezione sono evidenti cellule giganti, con nucleo chiaro e protrusioni citoplasmatiche. Successivamente compaiono cellule, di origine eritroblastica, che presentano una caratteristica marginazione della cromatina e inclusione nucleare eosinofila. All'osservazione in microscopia elettronica si osservano evidente marginazione della cromatina, vacuolizzazione citoplasmatica e protrusioni citoplasmatiche; questi cambiamenti sono normalmente associati alla morte cellulare per apoptosi. Sempre in microscopia elettronica sono osservabili arrangiamenti cristallini di particelle virali; questi sono presenti in sede nucleare, nella zona centrale libera da cromatina, e in sede citoplasmatica, nella zona immediatamente sottostante la superficie cellulare e anche all'interno delle protrusioni.

La replicazione in linee cellulari continue di derivazione emopoietica è invece più ristretta. Linee cellulari di derivazione eritroleucemica come K562, TF1 o HEL non sono permissive alla replicazione virale, probabilmente perché troppo indifferenziate. La replicazione è stata invece ottenuta in una linea eritroleucemica (JK-1) con caratteristiche di spiccata differenziazione eritroide [Takahashi et al., 1993; Soderlund et al., 1995; Srivastava et al., 1990] e in altre linee cellulari (KU812Ep6, UT-7 e MB-02) con caratteristiche megacarioblastoidi [Miyagawa et al., 1999; Munsh et al., 1993; Shimomura et al., 1992]. Nelle JK-1 lo stato di permissività è indipendente dalla eritropoietina; il trattamento con eritropoietina aumenta però il livello di permissività. Nelle altre linee il condizionamento con eritropoietina induce le cellule verso un differenziamento eritroide che consente la permissività cellulare; mentre le MB-02 vanno incontro a differenziamento terminale, le KU812Ep6 e le UT-7 mantengono un fenotipo sostanzialmente immaturo, che consente di mantenere l'infezione *in vitro* per periodi prolungati di tempo. La produzione di virus in tutti i sistemi cellulari permissivi all'infezione di parvovirus B19 rimane comunque molto limitata.

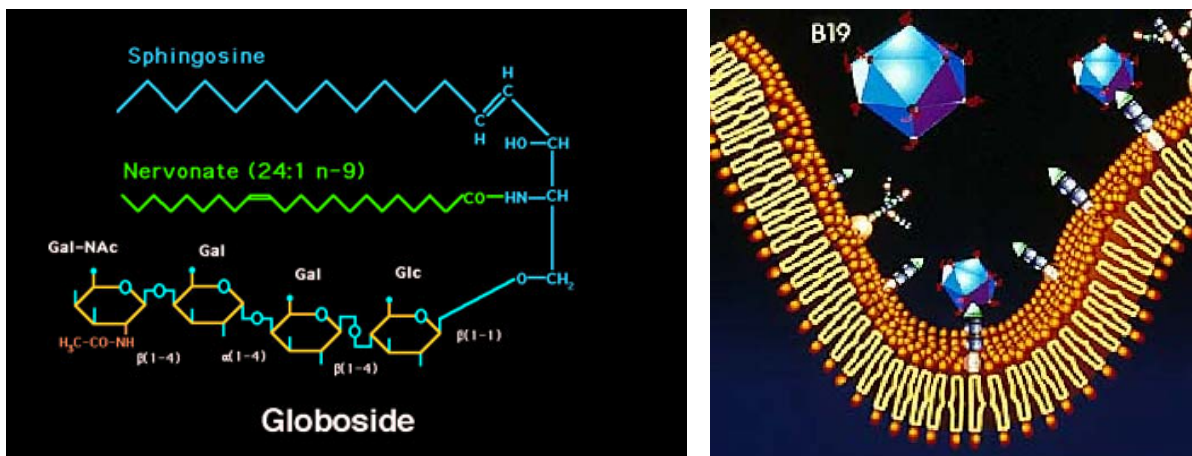
Ciclo virale

Il ciclo virale del parvovirus B19 inizia con il riconoscimento da parte delle proteine capsidiche di uno specifico recettore sulle cellule bersaglio; successivi eventi intracellulari portano alla replicazione ed espressione del genoma virale, consentendo la moltiplicazione del virus nelle cellule infette.

Recettore

La maggior parte dei parvovirus animali possiede attività emagglutinante, dovuta alla capacità di dominare sulle superfici dei virioni di legarsi a molecole presenti sulla superficie degli eritrociti. L'emagglutinazione può essere inibita competitivamente da molecole che reagiscono con il dominio

capsidico o con la proteina cellulare. Normalmente l'attività emagglutinante non è dovuta al legame fra il capsido e il recettore cellulare specifico, coinvolgendo domini e molecole cellulari differenti. Anche per il parvovirus B19 è stata evidenziata un'attività emagglutinante nei confronti di eritrociti umani e di altri primati [Brow, Cohen, 1992]. In questo caso, visto che le cellule bersaglio del B19 sono i precursori eritroidi, è stata ipotizzata l'identità fra molecola agglutinante e recettore virale. È stato quindi utilizzato un saggio di inibizione della emagglutinazione per identificare il recettore virale: capsidi ricombinanti prodotti in Baculovirus, che possiedono attività emagglutinante, sono stati preincubati con diverse frazioni della membrana eritrocitaria o di cellule UT-7 (permissive per il B19). Una inibizione ad alto titolo della emagglutinazione significa che in quella frazione è presente una molecola in grado di competere con il recettore per lo stesso sito di legame sul capsido. Frazionamenti successivi hanno identificato un glicolipide neutro di membrana, il globotetraosilceramide o globoside, come molecola in grado di inibire selettivamente l'emagglutinazione. Mediante esperimenti di cattura è stata inoltre dimostrata una capacità di legame specifica dei capsidi per il globoside purificato [Brown et al., 1993].



Struttura chimica del globoside e modello di interazione con il virus

La rilevanza biologica del legame fra capsido e globoside, che identifica quest'ultimo come il recettore cellulare per il B19, è stata dimostrata mediante esperimenti di neutralizzazione dell'infettività valutata su piastre di metilcellulosa. La presenza, contemporaneamente alla incubazione delle cellule di midollo con virus, di eccesso di globoside purificato o anticorpo anti-globoside è in grado di neutralizzare competitivamente l'infettività virale.

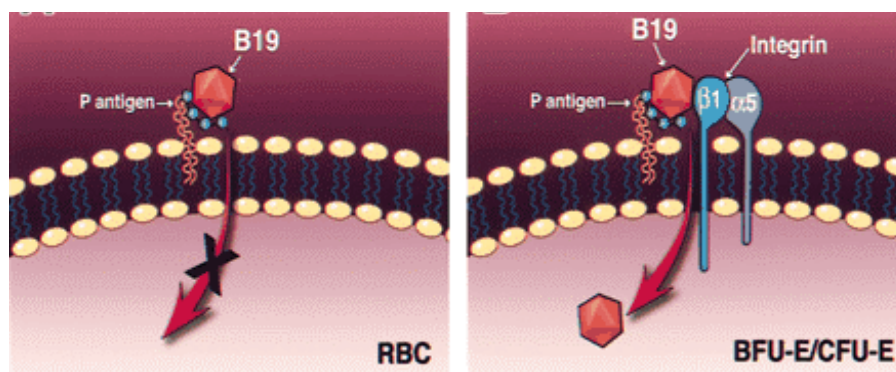
È degno di nota il fatto che il globoside costituisca l'antigene di gruppo eritrocitario P. Il polimorfismo allelico all'interno di questo gruppo antigenico determina la comparsa, seppur a bassa frequenza, di fenotipi che non esprimono il globoside sulla membrana cellulare (fenotipo p). È stato

visto come, in infezioni *in vitro*, tali cellule siano naturalmente resistenti all'infezione da parvovirus B19 e come individui di fenotipo p non abbiano segni sierologici di infezione da B19. Questo esempio ha costituito il primo caso di identificazione di una popolazione naturalmente resistente all'infezione da un virus per assenza geneticamente determinata del recettore cellulare [Brown et al., 1994].

I domini capsidici coinvolti nel legame con il recettore sono stati anch'essi analizzati utilizzando capsidi ricombinanti in saggi di emagglutinazione. Capsidi costituiti unicamente da VP2 hanno la stessa attività emagglutinante di capsidi completi, suggerendo che la proteina coinvolta nel riconoscimento del recettore è la VP2. L'emagglutinazione può essere inibita da anticorpi monoclonali che si legano a due diversi epitopi neutralizzanti situati fra gli aa 57-77 e 345-365 di VP2; queste regioni sono situate sulla superficie esterna del virione, presso l'asse ternario di simmetria del capside ("spike").

Co-recettore

Studi recenti documentano come la presenza sulla superficie cellulare del solo globoside non sia sufficiente alla corretta internalizzazione del parvovirus B19: linee cellulari eritroleucemiche come le K562 pur presentando sulla membrana il globoside non permettono il processo di penetrazione virale. Questa osservazione ha portato alla scoperta di molecole che fungono da co-recettori nell'infezione virale: le integrine di tipo $\alpha 5\beta 1$.



Modello di interazione virus-cellula

Queste molecole non sono presenti sulla superficie cellulare dei reticolociti (RBC: Red Blood Cells), su cui invece sono abbondanti le molecole di globoside e spiega quindi il mancato attacco cellula-virione negli eritrociti maturi; mentre nei BFU-E/CFU-E i livelli di globoside e $\alpha 5\beta 1$ sono entrambi elevati quindi il virus può essere correttamente internalizzato nella cellula bersaglio [Weigel-Kelley et al., 2001; Weigel-Kelley et al., 2003].

Eventi intracellulari

I meccanismi di internalizzazione del virus nel citoplasma, di traslocazione nel nucleo e di esposizione degli acidi nucleici non sono noti. Nel nucleo avviene invece la replicazione e trascrizione del DNA virale.

Analisi di sequenza effettuate sul genoma virale hanno evidenziato la presenza di un dominio fosfolipasico nella regione C-terminale della sequenza unica della VP1 (aa 130-195) [Dorsch et al., 2002; Zadori et al., 2001]; questo motivo enzimatico (PLA₂) sembra essere essenziale per l'infettività virale: l'attività fosfolipasica è infatti necessaria per l'efficace localizzazione nucleare del genoma del virus infettante.

Le modalità nella replicazione del DNA virale e nella sintesi dei messaggeri sono state studiate in colture sincronizzate di cellule UT-7 [Shimomura et al., 1993], in cellule UT-7/Epo S1 [Chisaka et al., 2003] e in progenitori eritroidi raccolti dal sangue periferico [Hemauer et al., 1999; Schwarz et al., 1992]. Il primo evento riconoscibile è la produzione dei messaggeri virali, tra cui la trascrizione del messaggero di NS sembra essere predominante, seguita dalla sintesi proteica. La proteina NS essendo coinvolta nella replicazione del virus deve tornare prontamente nel nucleo. Dopo la replicazione virale, la trascrizione sembra essere più marcata con produzione ed espressione delle proteine capsidiche. Anche queste devono tornare nel nucleo per incapsidare il genoma neoformato. Studi sul trasporto delle proteine virali dal citoplasma al nucleo delle cellule infettate hanno identificato una sequenza nella regione C-terminale della VP2 altamente conservata deputata al trasporto attraverso la membrana nucleare. Un'altra sequenza aminoacidica, sempre nella regione C-terminale della VP2, sarebbe implicata nell'autoassemblaggio dei virioni [Pillet et al., 2003].

Gli eventi che seguono l'attacco e penetrazione del virus nelle cellule sensibili al B19 mostrano differenze nei sistemi cellulari utilizzati. Questo significa che esistono diversi gradi di permissività all'infezione e quindi differenti livelli di restrizione nel ciclo replicativo virale. Un primo livello è legato alla capacità della cellula ospite di promuovere la sintesi di riparo della singola catena del DNA parentale, e quindi la trasformazione del DNA virale da catena singola in catena doppia, trascrivibile dalle RNA polimerasi cellulari. Un secondo livello di restrizione è invece legato alla completa sintesi delle proteine virali pur in presenza di un corredo completo di RNA messaggeri virus-specifici [Gallinella et al., 2000].

Epidemiologia

Prevalenza

L'infezione da parvovirus B19 è comune ed è presente in tutto il mondo. L'infezione è comunemente acquisita fra i 4 e i 10 anni di età; la prevalenza di anticorpi contro il parvovirus B19 è compresa tra il 15 e il 60% negli individui con età tra i 6 e i 19 anni e raggiunge l'85% nella popolazione geriatrica [Tsujiima et al., 1995]. Studi effettuati in diversi paesi mostrano lo stesso tipo di epidemiologia, con una prevalenza leggermente superiore in paesi a clima tropicale rispetto ai paesi con clima temperato: valori di prevalenza estremamente bassi sono esclusivi di gruppi tribali isolati in Africa o Sudamerica [Nascimento et al., 1990; Schwarz et al., 1989; de Freitas et al., 1990].

L'infezione nei paesi a clima temperato è più comune nel tardo inverno, primavera o inizio estate. Sono presenti cicli annuali, con aumentata prevalenza ogni 4-5 anni, e corrispondenti aumenti nella incidenza delle principali manifestazioni cliniche del B19, come eritema infettivo o crisi aplastiche.

Trasmissione

Il DNA di B19 è stato evidenziato nelle secrezioni respiratorie dei pazienti al momento della viremia, suggerendo che il virus è trasmesso attraverso la via respiratoria [Chorba et al., 1986]. Comunque, non è stato identificato alcun sito replicativo a livello del nasofaringe. La presenza del virus in feci o urina non è stata dimostrata.

Il virus si trasmette prontamente tramite contatto ravvicinato. Il tasso di sieroconversione in episodi infettivi epidemici può essere attorno al 50%; la trasmissione è più frequente in ambiente scolastico o familiare [Gillespie et al., 1990], anche se non è da escludere la trasmissione in ambiente nosocomiale [Bell et al., 1989].

L'infezione può essere trasmessa da sangue, attraverso trasfusione, e da emoderivati: molti studi riportano casi di trasmissione virale mediata da fattori della coagulazione (VIII e IX) [Azzi et al., 1999], da IVIG, IMIG, albumina e altri prodotti ottenuti da un largo numero di donatori [Robertson, Erdman, 2000; Brown et al., 2001]. Essendo infatti privo di envelope lipidico il B19 è resistente ai trattamenti chimici (con solventi/detergenti) e fisici (80°C per 72 ore) a cui sono di norma sottoposti i pool di plasma destinati alla produzione di emoderivati.

Dal Gennaio 2002, molte industrie produttrici di emoderivati hanno volontariamente iniziato un controllo sulle sacche di plasma per ridurre il rischio di trasmissione iatrogena [Brown et al., 2001].

Manifestazioni cliniche

Infezione sperimentale

Due studi effettuati mediante infezione di soggetti volontari hanno permesso di definire il corso dell'infezione [Anderson et al., 1985; Potter et al., 1987].

In entrambi gli esperimenti, i volontari (9 e 3 rispettivamente) sono stati infettati con una inoculazione intranasale di 10^8 particelle virali, essendo poi seguiti giornalmente e valutati mediante studi virologici, ematologici e chimico-clinici.

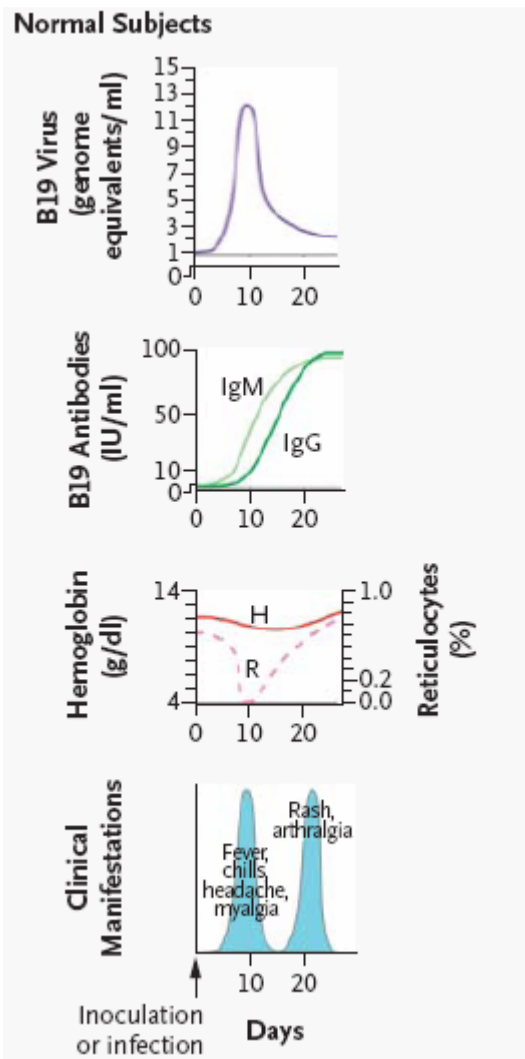
La viremia fu evidenziabile dal giorno 6 e raggiunse un picco il giorno 9, con 10^{11} particelle/ml (un livello comparabile a quanto osservato naturalmente, dove si possono raggiungere picchi di 10^{12} particelle/ml). Il virus fu inoltre rintracciato nelle secrezioni nasofaringee, esclusivamente in corrispondenza del picco viremico, mentre non fu evidenziato nelle feci o nell'urina. La viremia si risolse in corrispondenza dell'insorgere della risposta immunitaria.

A 6-8 giorni dall'inoculazione intranasale, i volontari accusarono sintomi tipici delle infezioni virali, con malessere associato a febbre; questi sintomi sono generalmente attribuiti alla produzione di citochine, ma non fu evidenziata produzione di α -interferone.

All'esame morfologico, il midollo osseo mostrò a 10 giorni una quasi totale deplezione dei precursori eritroidi a qualsiasi stadio di differenziamento; le BFU-E e CFU-E nel sangue periferico erano ridotte numericamente. Il compartimento mieloide appariva normale, ma fu evidenziata una riduzione di CFU-GM nel sangue periferico. Nella settimana successiva ci fu una caduta nella concentrazione emoglobinica, con modesta linfopenia, neutropenia e piastrinopenia.

Una seconda fase della malattia iniziò nella maggior parte dei volontari attorno al 16 giorno, in corrispondenza del picco nella produzione di IgM e con l'apparire della risposta immunitaria IgG, caratterizzata da prurito seguito dall'insorgenza di una eruzione cutanea maculo-papulare. Il rash si estese sugli arti, perdurando 2-4 giorni, e fu accompagnato da artralgia e lieve artrite per 4-6 giorni.

Tutti i volontari che avevano ricevuto più di 10^6 particelle virali nell'inoculo e che erano privi di anticorpi specifici svilupparono viremia e una successiva risposta anticorpale al virus. Volontari con livelli di IgG evidenziabili prima dell'inoculo non risultarono infetti, mentre un volontario con bassi livelli di anticorpi specifici sviluppò un'infezione con livelli minimi di viremia e stimolo della risposta immunitaria diretta nei confronti del virus.



Picco viremico e graduale clearance virale

Comparsa di anticorpi specifici di classe IgM e IgG

Depressione transitoria della funzionalità midollare: scomparsa dei reticulociti e modesto calo dell'emoglobina

Manifestazioni cliniche bi-fasiche: inizialmente sintomi aspecifici, poi rash e artralgia (quinta malattia)

Andamento dell'infezione sperimentale da parvovirus B19 in volontari umani

Infezione asintomatica

L'infezione da parvovirus B19 può decorrere completamente asintomatica. In casi documentati in corso di epidemia, il B19 causò un'infezione asintomatica nel 25-32% dei contatti domestici di pazienti con infezione in atto [Wolf et al., 1989].

Eritema infettivo

L'eritema infettivo (quinta malattia) è la più comune manifestazione dell'infezione da B19. Mentre la quinta malattia è una malattia descritta già all'inizio del secolo, la identificazione del B19 come agente eziologico è avvenuta solo nel 1983 a Londra, dopo che fu scoperta la presenza di anticorpi IgM nella totalità di 31 bambini affetti da eritema [Anderson et al., 1983; Anderson et al., 1984].

L'infezione è caratterizzata da sintomi prodromici non-specifici, cui possono seguire febbre, corizza, mal di testa, o lievi sintomi intestinali. Da due a cinque giorni dopo appare la caratteristica eruzione cutanea a "guance schiaffeggiate", con rossore sulle guance e pallore periorale. Da uno a quattro

giorni dopo compare il secondo stadio, con eruzione eritematosa maculopapulare su tronco e arti. Scomparendo, questa eruzione assume un tipico aspetto reticolato. Il rash può essere transiente, oppure ricorrere per settimane; l'aspetto può variare considerevolmente in intensità. Spesso sono presenti fastidiosi pruriti, specialmente alla pianta del piede.

Sindrome poliartropatica

Nel bambino l'infezione da B19 è di solito lieve e di breve durata; negli adulti, specialmente in donne, può esserci artropatia in circa il 50% dei pazienti [Torok, 1992]. Le articolazioni possono essere dolorose, spesso con ingrossamento e rigidità. La distribuzione è di solito simmetrica, con coinvolgimento soprattutto delle piccole articolazioni delle mani e del piede. I sintomi perdurano da 1 a 3 settimane, anche se in un 20% delle donne affette l'artropatia o una franca artrite possono persistere o ricorrere per più di due mesi (anche fino a due anni). Non esiste correlazione fra alto livello o persistenza di IgM anti B19 e durata della sintomatologia.

B19 e artrite reumatoide

Pazienti con artrite reumatoide classica sono stati studiati per determinare se esiste una maggiore prevalenza di anticorpi IgG anti-B19. Uno studio mediante RIA [Cohen et al., 1986] mostrò un aumento significativo di incidenza: 92.3% di pazienti con artrite reumatoide erano positivi, contro un 67.6% di pazienti con artrite infiammatoria e 60.9% nei pazienti di controllo. Il valore di questi risultati deve tenere conto della differente età media dei gruppi, maggiore nei pazienti con artrite reumatoide (54.8 anni) che negli altri due gruppi (40.2 e 45.2 anni rispettivamente).

In uno studio di 153 pazienti in Inghilterra [Klouda et al., 1986], 19 pazienti (12%) mostravano segni di infezione recente da B19. Essi presentavano un'improvvisa insorgenza di poliartropatia simmetrica periferica di moderata intensità; il fattore reumatoide era presente in solo uno dei pazienti. Sebbene almeno tre pazienti rispondessero ai criteri per essere considerati affetti da artrite reumatoide, non furono riportati danni a lungo termine o incapacità funzionali. Nello studio fu anche notata una correlazione positiva con l'antigene di istocompatibilità HLA-DR4.

Anche in assenza di dati sierologici di sicura interpretazione, il quadro che emerge indica che nelle fasi acute l'infezione da B19 può mimare l'artrite reumatoide, senza però che si sviluppino alterazioni degenerative a lungo termine.

Inoltre studi recenti hanno dimostrato la persistenza del DNA del B19 nelle membrane sinoviali, ma non nel liquido sinoviale, di pazienti con artriti reumatoidi o artriti non caratterizzate, con evidenze sierologiche di infezione pregressa da parvovirus B19 [Cassinotti et al., 1998; Takahashi et al., 1998]. Tuttavia non è certa la correlazione tra queste manifestazioni reumatiche e l'infezione da B19. Infatti la presenza del DNA di B19 nelle membrane sinoviali non sembra essere una evidenza

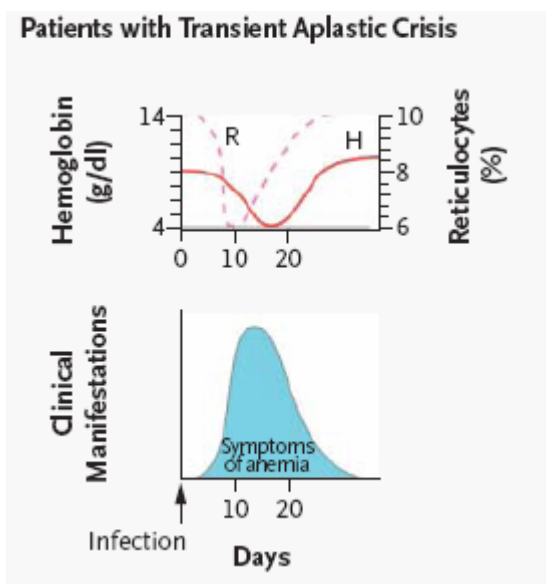
eziologica sufficiente di artropatia da B19 in quanto il DNA di B19 è stato riscontrato anche in un numero elevato di controlli sani [Soderlund et al., 1997].

Crisi aplastica

La crisi aplastica transitoria (TAC) è la cessazione improvvisa dell'eritropoiesi, caratterizzata da assenza dei precursori eritroidi nel midollo osseo, reticolocitopenia e anemia ingravescente. La TAC è stata la prima malattia associata all'infezione da B19. I primi casi furono individuati in Inghilterra fra pazienti immigrati dalla Giamaica affetti da anemia falciforme [Pattison et al., 1981]; un'analisi retrospettiva dimostrò che più di un 80% delle crisi aplastiche in corso di anemia falciforme era associata ad infezione recente da parvovirus B19 [Serjeant et al., 1981].

La TAC dovuta al parvovirus B19 è stata descritta in un ampio spettro di disordini emolitici, come sferocitosi ereditaria [Kelleher et al., 1983], enzimopatie eritrocitarie [Duncan et al., 1983], talassemia [Brownell et al., 1986], anemie emolitiche autoimmuni [Smith et al., 1989]. La TAC può insorgere in condizioni di stress eritroide, come emorragie, deficienza di ferro [Lefrere, Bourgeoi, 1986], o in seguito a trapianti di midollo o rene [Neild et al., 1986]. Anemia acuta è stata descritta in pazienti normali [Hamon et al., 1988], e una caduta nel numero di reticolociti e eritrociti è stata descritta nel corso delle infezioni di volontari, ma in questi casi è presente una sufficiente riserva emopoietica e i sintomi non sono evidenti.

L'infezione da B19 in pazienti ematologicamente normali può essere accompagnata da alterazioni in altre linee emopoietiche. Possono essere presenti vari livelli di neutropenia e trombocitopenia [Doran, Teall, 1988]. Casi di pancitopenia transitoria sono meno comuni [Hanada et al., 1988]. Anche se la malattia è normalmente autolimitante, i pazienti in crisi aplastica sono profondamente affetti. I sintomi includono non solo dispnea e stanchezza, ma anche scompenso cardiaco congestizio e necrosi severa del midollo osseo. Non trattata, la malattia può arrivare ad avere un decorso fatale; tipicamente, la crisi aplastica è trattabile mediante trasfusione, e grazie allo sviluppo della risposta immunitaria rimane un evento unico nella vita del paziente.



In soggetti con stress eritroide dopo il picco viremico e la produzione di anticorpi specifici (IgM e IgG) si instaura una depressione acuta ma transitoria della funzionalità midollare con scomparsa dei reticolociti e calo profondo dell'emoglobina [Saarinen et al., 1986].

Neutropenia, trombocitopenia e pancitopenia

L'infezione acuta da parvovirus B19 risulta spesso associata a fenomeni midollari di neutropenia e trombocitopenia. Il meccanismo di questi scompensi midollari non è chiaro. In molti casi questi disordini sono transienti e non clinicamente evidenti. Sono stati descritti però casi di porpora idiopatica trombocitopenica e porpora di Schoenlein-Henoch attribuiti ad infezione da B19: uno studio francese riporta che il 5% (3/61) pazienti con porpora idiopatica trombocitopenica mostrano segni evidenti di infezione recente da B19 [Lefrère et al., 1989].

Casi di pancitopenia transiente sono riscontrati meno frequentemente. Sono stati attribuiti all'infezione da B19 casi di neutropenia cronica nei bambini ma studi sierologici non sono stati in grado di confermare tale associazione [Hartman et al., 1994]. La sindrome emofagocitica, che può comparire in caso di numerose infezioni non solo di natura virale, è stata riscontrata anche in corso di infezione recente e persistente di B19 [Yufu et al., 1997]. L'emofagocitosi è caratterizzata da iperplasia istiocitica ed è solitamente una patologia benigna autolimitante.

Il ruolo del B19 in caso di eritroblastopenia transitoria dell'infanzia rimane da definire. La malattia colpisce i bambini di età compresa tra i 3 e i 4 anni e si manifesta con anemia, reticolocitopenia e diminuita presenza di precursori eritroidi [Hanada et al., 1989].

Disordine midollare cronico

Sindromi immunodeficitarie congenite

L'infezione persistente da B19 risultante in aplasia eritrocitaria pura (PRCA) è stata riportata in pazienti con sindromi immunodeficitarie congenite di diversa natura.

Il primo caso riportato fu di un bambino affetto da sindrome di Nezelof (difetto congenito combinato a cellule B e T), che presentò insorgenza acuta di anemia, reticolocitopenia e neutropenia [Kurtzman et al., 1987]. Alte concentrazioni di virus (10^8 particelle/ml) furono trovate nel siero in corrispondenza dell'insorgere dell'anemia, e si mantennero per 5 mesi. Pronormoblasti giganti, caratteristici dell'infezione da B19, furono identificati nel midollo, e il virus fu identificato nelle cellule midollari mediante ibridazione *in situ*. Il paziente fu trattato con trasfusioni e immunoglobuline; la remissione dell'anemia si accompagnò alla scomparsa del virus dal siero, mentre ricadute successive coincisero con episodi viremici.

In un secondo caso, un bambino di 21 mesi con immunodeficienza variabile (CD4 linfopenia con livelli normali di immunoglobuline) si presentò con anemia [Parvovirus infection, leukaemia, and immunodeficiency, 1989]. Il midollo mostrava ipoplasia eritroide con pronormoblasti giganti, e il DNA virale poté essere evidenziato nel siero. Il bambino rimase dipendente da trasfusioni per 7 mesi prima della remissione, ma ebbe una ricaduta 2 anni dopo.

In un terzo caso, una bambina di 12 mesi con immunodeficienza combinata grave (SCID) si presentò con anemia dovuta a infezione persistente da B19. Il DNA di B19 era presente nel siero, ma non furono evidenziate IgG; la bambina fu mantenuta mediante trasfusioni (ma non ricevette trattamento con immunoglobuline) fino alla morte avvenuta 3 anni dopo [Gahr et al., 1991].

Un caso di infezione persistente fu documentato in un paziente di 24 anni, da 10 anni con aplasia eritrocitaria pura; il DNA di B19 fu evidenziato mediante ibridazione nel siero e in cellule midollari, e mediante ibridazione *in situ* in tessuti di milza prelevati tre anni prima e conservati congelati. Il fratello gemello sviluppò PRCA contemporaneamente, ma morì per emosiderosi da trasfusione; anche in questo caso il DNA di B19 fu evidenziato mediante ibridazione *in situ* in sezioni di milza conservate congelate. Il paziente fu trattato con immunoglobuline, ottenendo l'eliminazione del virus da midollo e sangue periferico. Anche se non esisteva storia di aumentata suscettibilità alle infezioni, l'immunodeficienza si manifestava con anergia nella risposta cellulare.

L'infezione da parvovirus B19 può coinvolgere altre linee emopoietiche oltre all'eritroide, come dimostrato anche in casi di infezione persistente. Aplasia granulocitaria ricorrente senza alterazioni evidenti dei precursori eritroidi fu associata in un caso a infezione cronica da B19, documentata dalla presenza di DNA virale nel siero. Anche in questo caso la persistenza poté essere associata ad una ridotta risposta immunitaria cellulo-mediata.

Disordini linfoproliferativi

Infezioni croniche da parvovirus B19 sono state descritte in pazienti immunocompromessi per disordini linfoproliferativi, prevalentemente in bambini affetti da leucemie linfoblastiche [Parvovirus infection, leukaemia, and immunodeficiency, 1989; Kurtzman et al., 1988]. La

presentazione è con anemia persistente, senza i sintomi mediati da immunocomplessi quali eritema o artropatie. Altri componenti cellulari del midollo, quali megacarioblasti o linfoblasti, sono interessati e qualche paziente può essere pancitopenico. Il virus può essere evidenziato nel siero in maniera persistente o ricorrente, e l'esame del midollo osseo permette solitamente di riconoscere i pronormoblasti giganti; i livelli di anticorpi specifici anti-B19 sono bassi o nulli. La somministrazione di immunoglobuline può essere benefica, anche se non curativa. La temporanea cessazione della terapia di mantenimento chemioterapica può portare alla risoluzione dell'anemia, e in alcuni casi non si ha ricorrenza in corrispondenza della ripresa della terapia, suggerendo che la riduzione dell'immunosoppressione può consentire l'instaurarsi di una efficace risposta immunitaria nei confronti del virus.

Sindrome da immunodeficienza acquisita

La sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS) predispone all'infezione persistente da parvovirus B19. In un primo rapporto [Frickhofen et al., 1990], in 7 pazienti positivi alla sierologia per HIV e con PRCA fu evidenziata un'infezione persistente da B19; il DNA di B19 fu rivelato nel siero mediante ibridazione per un periodo di diversi mesi; anticorpi anti-B19 non furono rilevati in alcun paziente. L'infusione di immunoglobuline portò al miglioramento clinico dell'anemia, accompagnato dalla produzione di anticorpi specifici e dalla comparsa di sintomi da immunocomplessi come il rash eritematoso. In tutti i pazienti il virus rimase evidenziabile nel siero dopo amplificazione mediante PCR, e in tre pazienti vi furono anche ricadute dell'anemia indotte da B19, accompagnate da aumentata viremia.

In pazienti con AIDS le anomalie ematologiche sono comuni, e la maggior parte dei soggetti presenta anemia, granulocitopenia, e talvolta trombocitopenia. Queste alterazioni possono essere dovute a conseguenze immunologiche dell'infezione da HIV con depressione funzionale del midollo osseo, oppure all'effetto di infezioni opportunistiche. L'infezione persistente da parvovirus B19 richiede quindi una precisa diagnosi differenziale [Anderson et al., 1985; Musiani et al., 1995].

Pazienti trapiantati

L'infezione cronica da parvovirus B19 è stata descritta in seguito a trattamenti che richiedono forte immunosoppressione, come in pazienti trapiantati cardiaci o di fegato, o dopo trapianto renale [Gallinella et al., 1999; Torok, 1992]. Infezione cronica è stata evidenziata in due casi in seguito a trapianto allogenico di midollo osseo [Weiland et al., 1989]. Nel primo caso si sviluppò pancitopenia 9 mesi dopo il trapianto; il midollo osseo appariva ipocellulare, con presenza di pronormoblasti giganti, e fu evidenziata viremia prolungata per almeno 6 settimane; il paziente morì un mese dopo per insufficienza multipla e emorragia cerebrale. Nel secondo caso si sviluppò PRCA 1 mese dopo il trapianto, e il DNA di B19 fu evidenziato nel siero al momento dell'insorgenza del

difetto; in questo caso il paziente guarì spontaneamente. In entrambi i casi non è nota la sorgente di infezione.

Altri pazienti immunocompromessi

Anemie prolungate sono state descritte in stati meno severi di compromissione immunitaria (conseguente a trattamento steroideo o chemioterapico); in questi casi si può avere uno sviluppo ritardato della risposta immunitaria, con caratteri atipici di persistenza della risposta IgM o dei sintomi da immunocomplessi [Graeve et al., 1989]. Si tratta probabilmente di pazienti al limite dello spettro di risposta in sistemi immunitari compromessi.

Idrope fetale

È stato riportato un ampio numero di casi di infezione da parvovirus B19 in gravidanze concluse con esito avverso, sia aborto sia idrope fetale [Anand et al., 1987; Woernle, et al., 1987]. Allo studio patologico, i feti mostrano evidenza di reazione leucoeritroblastica nel fegato e presenza di grandi cellule chiare con corpi di inclusione eosinofili e marginazione della cromatina nucleare. Queste cellule sono sufficientemente caratteristiche per una diagnosi provvisoria di infezione da B19.

Sulla base di studi prospettici condotti in USA [Rodis et al., 1990] e Inghilterra [Miller et al., 1998] è stato possibile stimare il rischio di trasmissione transplacentare in donne con infezione da B19 nel 30% con un rischio di morte fetale del 5-9%. L'infezione se contratta nel secondo trimestre di gravidanza aumenta queste percentuali di rischio. Il parvovirus B19 probabilmente è causa del 10-20% delle idropi fetali non immuni [Jordan, 1996].

La patogenesi del danno fetale, maggiore nel secondo trimestre, è simile a quella che conduce alle crisi aplastiche in situazioni in cui la vita media degli eritrociti è ridotta. Anche se il virus è stato identificato in una diversa serie di organi (cuore, polmone, rene, timo), nella maggior parte dei casi il virus è situato all'interno dei lumi vascolari [Schwarz et al., 1991]. Il virus può essere identificato in microscopia elettronica nei tessuti emopoietici di fegato e timo [Field et al., 1991]. DNA e antigeni virali sono stati evidenziati in cellule miocardiche [Porter et al., 1988]. Inoltre c'è evidenza che il virus possa causare miocardite fetale, contribuendo allo stato di idrope [Morey et al., 1992]. Nel terzo trimestre il feto è capace di sviluppare una efficace risposta immunitaria nei confronti del virus, il che spiega la diminuita perdita fetale negli ultimi stadi di gravidanza.

La maggior parte dei casi di infezione di B19 contratta in gravidanza è comunque caratterizzata da decorso favorevole, senza perdita del feto. Alcuni studi riportano associazioni tra infezione intrauterina e malformazioni congenite quali anomalie agli occhi e al sistema nervoso, oltre che disordini midollari [Brown et al., 1994].

Disordini neurologici

Prima della messa a punto di specifiche tecniche virologiche, erano stati riportati in alcuni casi sintomi neurologici associati a eritema infettivo. Da allora è stata rilevata la presenza di anticorpi specifici per il B19 e di DNA virale nel sangue e nel liquido cefalorachidiano in casi fatali e non di encefalopatia e di meningite asettica [Heegaard et al., 1995; Zerbini et al., 1992]. Inoltre sono state anche viste neuropatia e amiotrofia neuralgica dopo infezione col virus. Il meccanismo che porta alla comparsa di tali sintomi neurologici è sconosciuto, anche se la concomitante presenza di rash o artralgia, fa supporre un processo mediato dal sistema immunitario.

Miocarditi

L'esame istologico e il ritrovamento di DNA specifico nel nucleo di miociti di feto dimostrano un tropismo del B19 per il cuore, che potrebbe anche contribuire alla comparsa di idrope fetale. In alcuni bambini e adulti sono state diagnosticate miocarditi e perimocarditi di notevole significato clinico [Enders et al., 1998]. La comparsa di miocarditi associate all'infezione da parvovirus potrebbe essere spiegata dalla presenza del recettore virale (antigene P) nei miociti o da una cross-reazione immunitaria coinvolgente epitopi condivisi da virus e miocardio.

Epatiti

L'aumento dei livelli di transaminasi epatiche si accompagna spesso alla quinta malattia e per questo motivo l'infezione da B19 è stata associata a epatiti severe ma autolimitanti nei bambini [Sokal et al., 1998; Pardi et al., 1998]. Numerosi studi escludono l'associazione tra B19 e epatiti acute (non-A-E) e croniche [Notari et al., 2001; He et al., 2003; Arista et al., 2003], altri ipotizzano una relazione causale tra B19 e insufficienza epatica fulminante [Langnas et al., 1995].

Infezioni persistenti

Normalmente l'infezione da parvovirus B19 in individui immunocompetenti ha un decorso limitato e termina con la clearance del virus dall'organismo, ma in alcuni casi può instaurarsi una infezione persistente in grado di causare aplasia midollare: anche se questo tipo di infezione è caratteristica soprattutto di pazienti con immunodeficienze congenite o acquisite, la ricerca del genoma virale mediante PCR ha dimostrato che si può avere persistenza del virus anche in individui immunocompetenti e per di più dotati di anticorpi contro il B19.

La presenza del virus è stata dimostrata in tessuti come la cute, il midollo osseo e la sinovia tramite saggi di nested-PCR: la ricerca del DNA virale in campioni di sangue e aspirati midollari ha dimostrato che è raro riscontrare la presenza costante di B19 nel sangue di pazienti sani e con evidenza sierologica di una passata infezione, mentre è possibile ritrovare il genoma virale nel

midollo osseo di individui con sintomi tipici dell'infezione (anemia o artriti) e in soggetti asintomatici nonostante la presenza di IgG anti-B19 [Cassinotti et al., 1997].

Studi recenti hanno inoltre verificato la persistenza del DNA virale nel tessuto sinoviale non solo di pazienti con artrite reumatoide o giovanile (manifestazioni che spesso accompagnano l'infezione primaria), ma anche in individui immunocompetenti, privi di artropatie e con anticorpi nei confronti del virus [Soderlund et al., 1997]. Al momento però non sono ancora state identificate le cellule in grado di ospitare il virus, anche se si ipotizza un coinvolgimento di cellule sinoviali con caratteristiche di cattura e presentazione dell'antigene, e rimane da stabilire quale sia il livello di funzionalità del genoma di B19 per quanto riguarda la sua capacità di trascrizione e replicazione [Hokynar et al., 2000].

La persistenza del virus a livello della cute è stata inizialmente documentata a partire dal campione bioptico di un ragazzo di 16 anni che aveva sviluppato un'orticaria cronica a seguito di un'infezione da parvovirus B19; questo studio ha messo inoltre in luce la presenza del DNA virale anche nella cute sana. Rimane da stabilire quale sia il sito esatto di persistenza virale [Vuorinen et al., 2002].

Le analisi molecolari su biopsie cutanee hanno permesso l'identificazione di nuovi genotipi, tra cui la variante V9 che mostra un tropismo particolare per i tessuti cutanei [Hokynar et al., 2002].

Trattamento e sviluppo di vaccini

Nella maggior parte dei casi l'eritema infettivo indotto dal parvovirus B19, nel bambino e nell'adulto, non richiede terapie farmacologiche specifiche. Esistono tuttavia immunoglobuline commerciali contenenti anticorpi anti-B19 che possono essere somministrate in caso di infezione persistente. La somministrazione di 0.4 g/Kg di peso per 5-10 giorni porta alla diminuzione del DNA virale sierico ed ad un marcato aumento della conta dei reticolociti e della concentrazione di emoglobina [Kurtz et al., 1989]. L'idrope fetale può risolvere spontaneamente, in caso contrario, le trasfusioni intrauterine sono state utilizzate con apparente successo per la riduzione della mortalità fetale [Forestier et al., 1999; Fairley et al., 1995; Goodear et al., 1998]. Le artropatie croniche sintomatiche possono essere trattate con farmaci anti-infiammatori non steroidei. Infine nel caso di crisi aplastica transitoria la trasfusione di eritrociti porta ad una soddisfacente concentrazione dell'emoglobina [Hamon et al., 1988].

La produzione di anticorpi diretti contro la proteina capsidica VP1 protegge dall'infezione da parvovirus B19 [Saikawa et al., 1993]: studi su animali indicano che vaccini allestiti con capsidi vuoti arricchiti in VP1, prodotti in Baculovirus inducono una forte risposta immunitaria. Anche sull'uomo questi vaccini appaiono promettenti e si aspettano conferme dai trials di fase II [Bansal et al., 1993].

Modelli animali

L'identificazione di virus infettanti i primati, all'interno del genere Erythrovirus, ha reso disponibile la presenza di modelli animali per l'infezione da B19. In particolare l'isolamento del Simian Parvovirus (SPV) si è rivelato di grande aiuto per lo studio di parvovirus B19. E' stata identificata infatti tra i due virus una somiglianza genomica e un'uguale tendenza a infettare cellule di midollo osseo *in vitro*. Anche nel caso di SPV l'infezione è seguita da fenomeni patologici diversi, dipendenti dallo stato immunitario dell'animale ospite. L'infezione di animali immunocompromessi porta ad anemia cronica, mentre negli animali immunocompetenti si assiste ad un calo transitorio dei reticolociti [O'Sullivan et al., 1994]. Inoltre, come avviene per il B19, l'infezione di feti con un sistema immunitario immaturo, porta alla comparsa di idrope fetale [O'Sullivan et al., 1997].

Il modello animale del Simian Parvovirus è considerato particolarmente utile, al fine di una maggiore e più dettagliata comprensione sulla patofisiologia dell'idrope indotta dal B19 e sulla scoperta di metodi migliori per il trattamento dei feti infettati.

Risposta immunitaria all'infezione da parvovirus B19

Risposta immunitaria normale

Anticorpi di classe IgM e IgG sono normalmente prodotti in seguito ad infezione da B19. Nei casi di infezione sperimentale [Anderson et al., 1985], dopo il picco viremico a 5-6 giorni dopo inoculazione intranasale, si ha comparsa di IgM a 10-12 giorni e di IgG dopo due settimane. In pazienti in crisi aplastica, anticorpi IgM sono già presenti al momento della crisi, mentre anticorpi IgG appaiono rapidamente e si accompagnano al superamento della crisi [Saarinen et al., 1986]. Gli anticorpi di classe IgM possono persistere per mesi dopo esposizione al virus; gli anticorpi di classe IgG presumibilmente persistono per tutta la vita, svolgendo un'azione protettiva nei confronti di una seconda infezione [Anderson et al., 1986]. Possono essere evidenziati anche anticorpi di classe IgA; questi possono giocare un ruolo nella protezione dall'infezione per la via naturale nasofaringea [Erdman et al., 1991].

Il decorso dell'infezione è fortemente influenzato dal grado di risposta immunitaria. Nell'infezione acuta, la viremia è di breve durata (1-3 giorni) e a titolo elevato (fino a 10^{12} particelle virali per ml); la depressione della funzione midollare caratteristica della fase acuta dell'infezione cessa, in condizioni normali, in seguito allo sviluppo di una risposta anticorpale neutralizzante. Sintomi come il rash eritematoso o il coinvolgimento articolare dipendono dalla formazione di immunocomplessi, e la viremia è raramente evidenziabile in questi pazienti. In pazienti con eritropoiesi iperattiva, maggiori quantità di virus possono essere prodotte relativamente ad una risposta immunitaria più debole, cosicché la formazione di immunocomplessi è minore e i relativi sintomi meno evidenti. In pazienti immunodepressi, così come nell'infezione intrauterina, la risposta immunitaria è più debole e può non essere in grado di produrre anticorpi neutralizzanti; si instaurano così infezioni persistenti, in cui il virus è presente nell'organismo per lunghi periodi a livelli ridotti ($<10^6$ particelle/ml).

Per quanto riguarda le proteine strutturali, recentemente, la risposta anticorpale IgG è stata studiata su un largo numero di campioni di siero provenienti da pazienti che mostravano diverse manifestazioni cliniche, correlabili all'infezione da B19, e su un ampio numero di sieri di controllo [Maresi et al., 1999]. I risultati ottenuti indicano che durante la fase attiva o molto recente dell'infezione, le IgG anti-epitopi lineari di VP1 compaiono nello stesso tempo e con la stessa frequenza delle IgG anti-epitopi conformazionali di VP2. Le IgG dirette verso gli epitopi lineari di VP1 e verso gli antigeni conformazionali di VP2 sembrano persistere per mesi o anni nella maggior parte degli individui, probabilmente perché hanno un ruolo neutralizzante nei confronti di regioni delle proteine capsidiche coinvolte nell'attacco e internalizzazione del virus. Le IgG dirette invece verso gli epitopi lineari di VP2, sono presenti in generale durante una fase attiva o molto recente

dell'infezione e durante la fase convalescente, mentre si evidenziano soltanto nel 20% dei soggetti che mostrano segni di passata infezione.

Risposta immunitaria cellulare

La misurazione della proliferazione linfocitaria *in vitro* dopo stimolazione con antigeni virali purificati ha identificato una risposta mediata da linfociti CD4+, MHC-II ristretta, diretta prevalentemente verso le proteine capsidiche [Yoshimoto et al., 1991]. Il tipo prevalente di risposta immunitaria all'infezione da parvovirus B19 è costituito dalla produzione di anticorpi con attività neutralizzante; tuttavia, la possibilità di instaurarsi di infezioni persistenti in soggetti con deficit immunologici a cellule T suggerisce che esse giochino un ruolo altrettanto importante che le cellule B nello sviluppo della risposta immunitaria. È probabilmente l'interazione fra tipi cellulari T e B a determinare lo sviluppo di uno stato immunitario pienamente competente.

Epitopi virali neutralizzanti

Regioni contenenti epitopi neutralizzanti sono state localizzate su diverse sequenze lineari delle proteine capsidiche di B19. Una regione è situata all'estremità aminotermine di VP2 (aa 38-87) [Yoshimoto et al., 1991], mentre altre 6 sono distribuite nella metà carbossiterminale di VP2 (aa 253-515) [Sato et al., 1991]; diverse regioni sono presenti nella sequenza VP1 specifica [Rosenfeld et al., 1992]. La maggior parte di questi epitopi è situata nelle regioni di ansa interposte fra i fogli β -planari delle proteine capsidiche, essendo quindi esposte alla superficie esterna del virione.

La presenza della proteina VP1 nei capsidi ha due effetti: modifica la presentazione degli epitopi VP2 specifici e aggiunge epitopi specifici propri alla superficie del virione. Anticorpi nei confronti della regione unica di VP1 possono precipitare sia capsidi ricombinanti sia virioni nativi, indicando che questa regione è esposta alla superficie esterna; questi anticorpi possiedono inoltre attività neutralizzante. Epitopi lineari nella regione VP1 specifica sono estremamente efficienti nello stimolare una risposta anticorpale neutralizzante. Anticorpi nei confronti di epitopi della proteina VP2 ottenuti immunizzando animali con capsidi costituiti unicamente da VP2 non hanno attività neutralizzante. La proteina VP2 contiene epitopi neutralizzanti, ma questi sono presenti solo nei virioni completi; questi risultati suggeriscono che la presenza della VP1 nei capsidi alteri la struttura del virione e la presentazione antigenica. Inoltre, la maggior parte degli anticorpi con attività neutralizzante non riconosce sequenze peptidiche isolate ed è presumibilmente rivolta ad epitopi conformazionali [Saikawa et al., 1993].

Anticorpi specifici anti-VP1 e anti-VP2 sono presenti nel siero convalescente in fase precoce, ed entrambi possono avere attività neutralizzante; in sieri convalescenti in fase tardiva prevalgono gli anticorpi neutralizzanti anti-VP1. L'infezione persistente è il risultato dell'incapacità di produrre

anticorpi con efficace attività neutralizzante [Kurtzman et al., 1989]. Nella maggior parte dei pazienti immunocompromessi non sono evidenziabili anticorpi specifici, mentre in altri esiste una risposta con caratteristiche di immaturità (presenza di IgM e IgG dirette verso la VP2). Questi anticorpi reagiscono in saggi di cattura radioimmunologici, mentre non reagiscono all'immunoblot; ciò suggerisce che essi siano diretti verso epitopi di tipo conformazionale, mentre non sono in grado di riconoscere epitopi lineari. La scarsa reattività immunologica è in correlazione con una scarsa attività neutralizzante determinata in saggi di inibizione dell'infettività *in vitro*.

Principi diagnostici

Come per tutti i virus, la diagnosi di infezione può essere fatta direttamente, dimostrando la presenza del virus nell'organismo, oppure evidenziando una risposta immunitaria specifica nei confronti del virus in questione.

Nel caso del parvovirus B19, l'impossibilità di coltivare efficacemente il virus in sistemi cellulari *in vitro* impone di utilizzare mezzi di ricerca diversi dal semplice isolamento; in pratica, è necessario evidenziare nei campioni clinici il virus, mediante microscopia elettronica, oppure i suoi costituenti quali il genoma o la componente antigenica.

Il riscontro di una risposta immunitaria specifica nei confronti del parvovirus B19, ed in particolare nei confronti delle proteine capsidiche VP1 e VP2, fornisce informazioni indirette sull'infezione; la presenza di anticorpi di classe IgM è indicativa di infezione recente, mentre la presenza di IgG in assenza di IgM è indicativa di infezione passata e immunità nei confronti del virus. Tecniche per la ricerca anticorpale sono dipese per lungo tempo dalla disponibilità di virus nativo; recentemente sono state sviluppate tecniche che si affidano ad antigeni prodotti *in vitro* in sistemi ricombinanti procariotici o eucariotici. Tali sistemi includono: cellule di E. Coli trasformate con plasmidi ricombinanti, che esprimono antigeni di B19 come proteine di fusione [Liu et al., 1991; Soderlund et al., 1995]; cellule di ovaio di Hamster cinese trasfettate con plasmidi ricombinanti che esprimono antigeni del B19 [Kajigaya et al., 1989]; cellule di mammifero COS-7 trasfettate con vettori di espressione derivati dall'SV40 contenenti sequenze che esprimono proteine del B19 [Cohen et al., 1995], e cellule di insetti (*Spodoptera frugiperda*) infettate con Baculovirus ricombinanti con sequenze del B19 [Brown et al., 1991; Kajigaya et al., 1991]. Recentemente anche la proteina non strutturale NS del B19 è stata espressa in sistemi procariotici ed eucariotici [Venturoli et al., 1998; von Poblitzki et al., 1995].

Diagnosi virologica

Ricerca del DNA virale

La diagnosi di infezione da parvovirus B19 è affidata principalmente alla ricerca del DNA virale attraverso tecniche di amplificazione degli acidi nucleici visto che alti livelli di viremia sono riscontrabili solo durante la fase acuta dell'infezione e per un breve periodo, circa una settimana, mentre bassi livelli di DNA possono essere rivelati anche per sei mesi solo tramite PCR. Per questi motivi tecniche poco sensibili come ibridazioni su filtro e su piastra non sono più utilizzati nella diagnosi di infezione: rimane tuttavia in uso l'ibridazione *in situ* in quanto permette di localizzare il DNA virale nel materiale in esame, cellule di midollo osseo, di sangue cordonale, liquido amniotico, tessuti fetali, cutanei, ecc.

Ibridazione in situ

Questa tecnica di ricerca del DNA virale è utile non solo per la diagnosi di infezione ma anche per lo studio della patogenesi delle malattie associate al B19. I campioni vengono opportunamente fissati e permeabilizzati per permettere l'ingresso delle sonde. Le sonde usate sono ottenute da frammenti di DNA clonato o da oligonucleotidi sintetici. Le sonde marcate con digossigenina sono attualmente più usate, poiché dotate di maggiore specificità e sensibilità; la presenza del marcante è rivelata con metodo immunoenzimatico, con l'utilizzo di substrato cromogenico o chemiluminescente e l'osservazione, rispettivamente, mediante microscopio ottico o luminografo connesso a un microscopio ottico e a un computer.

Reazione polimerasica a catena (PCR)

La PCR è la più sensibile tecnica diagnostica per rivelare il DNA virale; essa permette l'amplificazione di un numero minimo di copie genomiche, tipico degli stadi finali di infezione acuta o di infezioni persistenti. Per le reazioni di amplificazione possono essere utilizzate piccole aliquote di campioni di siero (eventualmente pretrattati), cellulari o tissutali (previa lisi e/o purificazione del DNA).

Sono stati sperimentati saggi di amplificazione del DNA di B19 in vari formati, nel tentativo di ottenere una rivelazione non solo qualitativa ma anche quantitativa del DNA bersaglio, tra cui: single-step PCR [Durigon et al., 1993; Koch et al., 1990], nested PCR [Musiani et al., 1993], PCR-ELISA, PCR-ELISA competitiva [Gallinella et al., 1997] e Real-Time PCR [Aberham et al., 2001]. La necessità di effettuare una determinazione quantitativa del carico virale di B19 (ad esempio nello screening di emoderivati [Koppelman et al., 2004; Baylis et al., 2004] o nel monitoraggio di infezioni persistenti) ha fatto sì che negli ultimi anni si sviluppassero tecniche diagnostiche di Real-Time PCR: questi saggi quantitativi risultano rapidi in quanto l'amplificazione del DNA bersaglio e la rivelazione dei prodotti di amplificazione sono combinati all'interno di un unico sistema. La reazione inoltre viene monitorata ciclo per ciclo e l'analisi quantitativa dei dati viene effettuata non al termine della reazione, come in una PCR end-point, bensì durante la fase esponenziale di accumulo dei prodotti, quindi risulta molto più accurata.

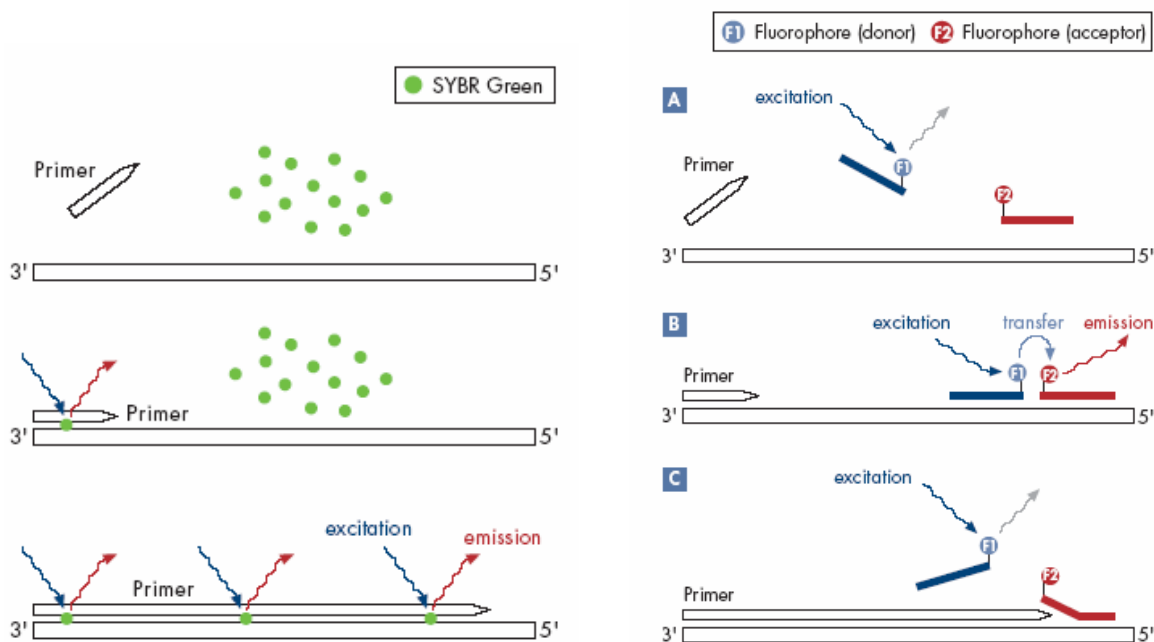
Per la diagnosi di infezione di parvovirus B19 e determinazione quantitativa del carico viremico sono disponibili in commercio saggi di real-time che utilizzano come sistema di rivelazione la fluorescenza: il colorante SybrGreen I e le sonde di ibridazione [Braham et al., 2004; Shorling et al., 2004; Harder et al., 2001].

Inoltre, dopo l'identificazione di Erythrovirus umani diversi dal genotipo B19 sono stati messi a punti saggi quantitativi che per la discriminazione e tipizzazione virale, con primer e sonde genotipo-specifici [Schalasta et al., 2004; Hokynar et al. 2004; Liefeldt et al., 2005].

Il Sybr Green I è una molecola fluorescente che è in grado di legarsi al DNA a doppia catena intercalandosi in esso. Il segnale di fluorescenza emesso è proporzionale alla quantità di acido nucleico presente nel campione in esame e viene registrato al termine della fase di estensione in ogni ciclo di amplificazione.

Le sonde di ibridazione consistono invece in un sistema di rivelazione sequenza specifico. Si utilizzano due oligonucleotidi marcati con fluorocromi differenti che riconoscono due sequenze adiacenti sul DNA bersaglio. L'oligonucleotide a monte è marcato all'estremo 3' con fluorescina, mentre l'altro possiede in posizione 5' il fluorocromo LC Red 640 o LC Red 705. Durante la fase di annealing le due sonde riconoscono le rispettive regioni del DNA bersaglio e dal momento che i fluorocromi sono adiacenti, si verifica un trasferimento di energia per risonanza, detto FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), dalla fluorescina eccitata dalla sorgente luminosa esterna al fluorocromo accettore (LC Red 640 o LC Red 705) che, eccitato, emette a sua volta un segnale fluorescente ad una lunghezza d'onda maggiore. In questo caso il segnale di fluorescenza viene registrato in ogni ciclo di amplificazione al termine della fase di annealing.

Real Time PCR in formato SybrGreen e FRET



La quantificazione dei prodotti di amplificazione mediante PCR real time può essere assoluta o relativa. Una quantificazione assoluta richiede la costruzione di una curva di calibrazione mediante l'amplificazione di una serie di standard esterni a concentrazione nota; la concentrazione dei campioni incogniti viene determinata per interpolazione sulla curva di calibrazione. Questo metodo non rivela l'eventuale presenza di inibitori della PCR, né tiene conto della variabilità tra campione e

campione dovuta sia alla processazione del campione sia alla fase analitica, a meno che in ogni reazione di amplificazione non venga incluso anche un controllo interno che viene coamplificato.

Una quantificazione relativa invece esprime la concentrazione di un campione come rapporto tra la sequenza bersaglio e una sequenza di riferimento che può essere esogena o endogena [Gallinella et al., 2004].

Ricerca degli antigeni virali

Tecniche per la dimostrazione della presenza del virus in campioni di siero mediante ricerca della componente antigenica hanno storicamente preceduto lo sviluppo delle tecniche per l'individuazione del DNA virale. In particolare, tecniche come la contro-immunoelettroforesi o la immunodiffusione hanno contribuito alla scoperta del virus ma non sono più comunemente utilizzate. Il saggio radioimmunologico volto alla ricerca antigenica può essere utilizzato, ma ha una specificità e una sensibilità nettamente inferiori alle tecniche di ibridazione molecolare. Tecniche di immunoelettromicroscopia sono utilizzabili per la conferma morfologica della presenza di virus in campioni di siero. E' possibile inoltre ricercare gli antigeni del virus nei campioni clinici (sangue periferico e liquido amniotico) impiegando saggi immunologici su filtro [Gentilomi et al., 1997; Gentilomi et al., 1998]. Tecniche di ricerca antigenica sono utilizzate per la individuazione delle componenti capsidiche all'interno delle cellule infette. L'utilizzo di sieri immuni policlonali o di anticorpi monoclonali diretti verso le proteine VP1 e VP2 in tecniche di immunofluorescenza indiretta permette di evidenziare il virus in cellule infette di provenienza ematologica o in tessuti di origine fetale.

Diagnosi sierologia

Saggio immunoenzimatico (EIA)

Gli antigeni capsidici normalmente impiegati per una diagnosi sierologica di infezione da parvovirus B19 sono prodotti in cellule di insetto utilizzando il sistema dei Baculovirus [Brown et al., 1991]. Con questo sistema è possibile ottenere elevate quantità di particelle simil-virali, costituite dalle proteine VP1 e VP2, oppure unicamente dalle proteine VP2. Queste particelle presentano determinanti antigenici coincidenti con quelli presentati da particelle virali native, e quindi il loro impiego in tecniche di ricerca anticorpale garantisce risultati estremamente affidabili. Il formato maggiormente impiegato si basa su tecniche immunoenzimatiche su micropiastra (formato ELISA). Per la ricerca di IgG specifiche si utilizza un saggio indiretto, mentre per la ricerca di IgM si preferisce un saggio di cattura delle IgM specifiche. Nel primo caso antigeni biotinilati sono ancorati a pozzetti rivestiti di streptavidina e fatti reagire con il siero in esame; la formazione di immunocomplessi è rivelata mediante anticorpi secondari coniugati all'enzima

perossidasi. Nel secondo caso, anticorpi di classe IgM sono catturati da anticorpi anti-IgM ancorati a pozzetti di micropiastra; queste IgM legano poi antigeni biotinilati che verranno a loro volta riconosciuti utilizzando streptavidina coniugata all'enzima perossidasi.

Saggio di immunofluorescenza (IF)

Reazioni di immunofluorescenza per la ricerca di anticorpi specifici di classe IgG o IgM possono essere allestite utilizzando come substrato le cellule di insetto transfettate con vettori di Baculovirus esprimenti le proteine capsidiche di parvovirus B19 [Cohen et al., 1995]. In questo caso la reazione è di tipo indiretto (per la ricerca di IgM è opportuno procedere ad un pre-assorbimento delle IgG), e la formazione di immunocomplessi è evidenziata mediante anticorpi secondari coniugati a fluorocromi (FITC).

Saggio di Western Blot

Le proteine virali, oppure frammenti di esse, prodotte in sistemi procariotici, possono essere utilizzate come substrato antigenico in reazioni di immunoblot. Esistono sistemi commerciali che consentono lo studio della risposta anticorpale nei confronti delle proteine del parvovirus B19. In questo caso vengono ad essere evidenziati anticorpi di classe IgG o IgM diretti verso epitopi lineari, e non conformazionali, del capsido di B19. Tale tecnica è meno utilizzata della tecnica ELISA poiché è meno sensibile, più costosa e non è applicabile allo screening di un numero elevato di campioni.

Tuttavia è importante lo studio della risposta anticorpale nei confronti degli antigeni lineari del B19 in quanto a tutt'oggi non è ben nota la specifica risposta anticorpale, nelle diverse fasi di infezione, nei confronti di diverse regioni immunoreattive e di diversi epitopi lineari o conformazionali delle proteine capsidiche. Inoltre è dimostrato che la maggior parte degli epitopi neutralizzanti della VP1 sono epitopi lineari [Manaresi et al., 1999; Manaresi et al., 2001].

Parte Sperimentale

Premessa e scopo del lavoro

L'attività di ricerca svolta durante il corso di Dottorato di Ricerca in Biotecnologie Mediche ha riguardato l'analisi funzionale di cloni genomici e subgenomici di Parvovirus B19 in sistemi cellulari sensibili e permissivi alla replicazione del virus.

Il Parvovirus B19 è classificato nel genere Erythrovirus della famiglia Parvoviridae all'interno della quale è l'unico virus patogeno per l'uomo. È privo di envelope e possiede una struttura icosaedrica di 25 nm. Il 95% del capside è costituito dalla proteina VP2 (58 KDa) e il 5% dalla proteina VP1 (84 KDa), identica alla VP2 con 227 aminoacidi in più all'estremità aminotermine. Il genoma del B19 è costituito da un singolo filamento di DNA di 5596 nucleotidi. Una sequenza unica codificante (4830 nt) è fiancheggiata ad entrambi i lati da sequenze terminali in ripetizione invertita (ITR) di 383 basi, delle quali le 365 distali contengono un asse di simmetria e formano un palindromo imperfetto in grado di ripiegarsi su se stesso in un segmento bicatenario a forcina. La struttura in questione funge da innesco per la sintesi di catene complementari a quella originale, la quale è poi processata per taglio della proteina NS a livello della sequenza terminale, in un punto opposto all'origine della sintesi. Il completamento del duplex per sintesi di riparo genera due molecole di DNA genomico a polarità opposta che vengono impacchettate indipendentemente in particelle virali neoformate. Tale modello replicativo implica l'esistenza di forme intermedie di replicazione, la cui identificazione ha contribuito a validare il modello stesso.

Insieme alla proteina NS (77 kDa), coinvolta nella replicazione, nella regolazione trascrizionale e dotata di funzione citotossica, e alle proteine capsidiche, il genoma virale codifica anche per due proteine non strutturali di 7 kDa e 11 kDa, la cui funzione è meno conosciuta.

Il Parvovirus B19 è implicato in una molteplicità di situazioni patologiche nell'uomo; l'evolversi dell'infezione e le sue manifestazioni sono dipendenti dallo stato fisiologico dell'ospite e dall'entità della sua risposta contro il virus. Il B19 può causare infezioni asintomatiche o patologie acute come l'eritema infettivo (quinta malattia) nei bambini, artralgie transitorie negli adulti, crisi aplastiche in pazienti con anemia emolitica, infezioni persistenti associate ad aplasia midollare cronica in individui immunocompromessi; inoltre in caso di infezione materna in gravidanza può portare a idrope fetale.

Studi recenti sulla sensibilità cellulare al virus hanno portato a concludere che la sola presenza sulle cellule bersaglio del recettore di membrana, il globoside P [Brown et al., 1993], non è sufficiente alla corretta internalizzazione del Parvovirus B19. Sono infatti necessarie delle integrine di tipo $\alpha 5\beta 1$, che fungono da co-recettori e contribuiscono alla penetrazione del virus nella cellula. Inoltre

recentemente è stato osservato che anche il recettore KU80 è coinvolto nei processi di internalizzazione virale [Munakata et al., 2005]. La replicazione virale è condizionata da fattori intracellulari: l'infezione del Parvovirus B19 è di tipo restrittivo e la formazione di una progenie virale è limitata a cellule in fase S, in quanto dotate di fattori necessari alla sintesi del DNA, non ancora ben noti. Si è ipotizzato esistano differenti livelli di restrizione in relazione alla capacità della cellula di garantire la replicazione, la trascrizione e quindi la traduzione dell'informazione genetica portata dal virus.

Il Parvovirus B19 mostra uno specifico tropismo per la linea eritroide del midollo osseo. Le cellule staminali non sono infettate, ma i target cellulari maggiormente permissivi alla replicazione virale sono i progenitori BFU-E, CFU-E e gli eritroblasti [Takahashi et al., 1990]. Infatti, la preincubazione di BFU-E e CFU-E dal midollo con siero viremico causa l'assenza di colonie eritroidi [Mortimer et al., 1983]. I progenitori eritroidi possono essere ottenuti dal midollo e coltivati in vitro per consentirne l'utilizzo come sistema permissivo per la replicazione del Parvovirus B19 [Ozawa et al., 1986; Ozawa et al., 1987; Srivastava et al., 1988]. I precursori che possono essere infettati sono presenti anche nel sangue periferico [Schwarz et al., 1992], cordone ombelicale [Srivastava et al., 1992] e fegato fetale [Brown et al., 1999; Yaegashi et al., 1989]. L'immunocaratterizzazione delle cellule permissive presenti nel fegato fetale ha mostrato che queste cellule sono CD36⁺ e presentano la glicoforina A e C [Morey et al., 1992].

La replicazione del B19 in linee cellulari è più ristretta. Essa è stata ottenuta in cellule JK-1 [Takahashi et al., 1989; Takahashi et al., 1993], in cui è particolarmente evidente un differenziamento eritroide, e in altre linee cellulari con caratteristiche megacarioblastoidi come le KU812Ep6 [Miyagawa et al., 1999], le UT7/Epo [Shimomura et al., 1992] e le UT7/Epo-S1, un subclone delle UT7/Epo [Morita et al., 2001]. Per le suddette linee cellulari, l'uso di eritropoietina induce un differenziamento in senso eritroide, tale però da mantenere un fenotipo immaturo e permettere così il mantenimento dell'infezione in vitro per lungo tempo. Le UT7/Epo-S1 presentano la più alta sensibilità e permissività alla replicazione e all'espressione del virus. Tuttavia, anche i sistemi cellulari permissivi consentono solo un grado ridotto di replicazione del virus e dunque non permettono di ottenere grandi quantità di virus infettante.

Parte di tale lavoro ha riguardato la generazione, mediante un saggio di eritropoiesi in vitro, di una popolazione pura di progenitori eritroidi CFU-E, che presentano sulla membrana cellulare l'antigene di superficie CD36. Tali cellule si sono rivelate altamente permissive alla replicazione del Parvovirus e hanno condotto all'instaurarsi di un'infezione produttiva.

L'analisi in vitro del Parvovirus B19 e della patogenesi molecolare ad esso associata è inoltre vincolato dal fatto che la fonte stessa del virus è limitata e ristretta a sieri altamente viremici.

La necessità di avere a disposizione un sistema per manipolazioni in vitro, per effettuare un'analisi genetica al fine di una migliore interpretazione della biologia del virus e delle interazioni virus-cellula ospite, ha spinto diversi laboratori verso la progettazione di un clone genomico infettante del B19, che potesse mimare il virus, permettendo al ricercatore un'indagine più accurata di quella consentita col virus wild type.

Una parte di tale lavoro ha avuto come oggetto di studio l'analisi comparativa di tre cloni contenenti il genoma full-length di Parvovirus B19.

Tali cloni genomici erano stati precedentemente e indipendentemente progettati e costruiti in tre diversi laboratori di ricerca: il laboratorio di Virologia Speciale del Dipartimento di Medicina Clinica Specialistica e Sperimentale dell'Università di Bologna, il Virus Discovery Group dell'NHLBI dell'NIH di Bethesda (Maryland, USA) e il laboratorio di Virologia dell'Università di Helsinki (Finlandia).

L'analisi comparativa dei cloni contenenti il genoma full-length del Parvovirus è stata effettuata sulla linea cellulare UT7/Epo-S1 e sulla coltura primaria di cellule progenitrici eritroidi CD36⁺.

I tre cloni genomici pHG1, pB19-M20 e pB19FL sono stati analizzati e confrontati in termini di produzione di particelle virali e capacità infettante delle stesse. L'analisi funzionale della capacità infettante dei tre cloni genomici è stata affiancata da un'analisi strutturale degli stessi, al fine di individuare differenze rilevanti in regioni critiche che potessero avere un effetto sull'attività biologica e alterarne l'infettività in vitro. A tale proposito è stata rivolta particolare attenzione alla regione della VP1 unica che studi precedenti [Zadori et al., 2001; Dorsh et al., 2002] avevano indicato come particolarmente critica per l'infettività del virus.

Il clone genomico pB19-M20 è stato anche utilizzato per un'analisi di mutagenesi per definire il ruolo di ciascuna proteina virale nel ciclo replicativo. Sono stati costruiti mutanti del B19 andando a bloccare sistematicamente l'espressione delle diverse proteine virali, e si è successivamente osservato l'effetto fenotipico in termini di replicazione e produzione di virus infettante.

Il clone genomico pHG1 è stato utilizzato come riferimento capace di mimare il comportamento del virus wild type in un'analisi quantitativa mediante real time PCR di un sistema di cloni subgenomici (pHH1, pHH0, pHI0, pHJ0) ottenuti clonando il genoma virale contenente frazioni progressivamente minori delle TR (rispettivamente in posizione 3-203 bps e 5034-5234 bps per pHH1 e pHH0, 1-141 bps e 4972-5108 bps per pHI0, 7-26 bps e 4857-4876 bps per pHJ0).

Insieme ai cloni sopramenzionati è stato preso inoltre in analisi il ccdDNA, un costrutto costituito dal genoma del B19 in forma bicatenaria, circolarizzato, che riproduce un intermedio replicativo del virus.

L'osservazione in parallelo in termini di attività traduzionale, trascrizionale, replicazionale relative

ai vari cloni ha permesso di analizzare il ruolo delle TR stesse nel ciclo virale del B19 e l'eventuale necessità che queste siano integre per mediare le proprie funzioni.

Materiali e Metodi I - Generazione di cellule CD36⁺

Coltura cellulare

Le cellule CD34⁺ umane sono state isolate da cellule staminali di sangue periferico di donatori sani mediante il metodo di selezione Baxter Isolex 300 (Baxter Immunotherapy). Dopo criopreservazione le cellule sono state riselezionate per l'antigene CD34 e coltivate in un terreno privo di siero a 37°C con il 5% CO₂, modificato da un protocollo precedentemente sviluppato per ottenere eritrociti maturi [Giarrattana et al., 2005].

Le cellule sono state coltivate per 4 giorni in terreno di mantenimento contenente BIT 9500 (Stem Cell Technologies), diluito 1:5 in AMEM (Mediatech) per una concentrazione finale di 10 mg/ml di BSA deionizzata, 10 µg/ml di insulina ricombinante, 200 ng/ml di transferrina umana iron-saturated, e arricchito con 900 ng/ml di solfato ferroso (Sigma) e 90 ng/ml di nitrato ferrico (Sigma).

Una quantità pari a 10⁴ cellule/ml è stata coltivata in un terreno di espansione contenente il terreno di mantenimento suddetto arricchito con 10⁻⁶ M di Idrocortisone (Sigma), 100 ng/ml di stem cell factor umano ricombinante (SCF, StemCell Technologies), 5 ng/ml di interleukina-3 umana ricombinante (IL-3, R&D Systems), 3 IU/ml di eritropoietina umana ricombinante (EPO, Amgen).

Al giorno 4 di coltura in terreno di espansione, 1 volume di coltura cellulare è stato espanso in 4 volumi di terreno fresco.

Come controllo di riferimento, è stata utilizzata la linea cellulare megacarioblastoide UT7/Epo-S1 [Morita et al., 2001]. Le cellule UT7/Epo-S1 sono state coltivate in terreno IMDM (Iscove's modified Dulbecco), arricchito con siero bovino fetale 10% (FBS), penicillina, streptomina, L-glutamina (100X P/S/G: Gibco/Invitrogen) e 2 IU/ml EPO a 37°C con il 5% di CO₂.

In un'analisi comparativa, le cellule oggetto di studio sono state analizzate per la capacità di crescita in terreno IMDM arricchito con 50 ng/ml di IL-3 e 5 IU/ml di EPO, e le cellule UT7/Epo-S1 in terreno di espansione delle CD34⁺.

La crescita delle UT7/Epo-S1 e delle CD34⁺ è stata seguita giornalmente e ne è stata calcolata la percentuale di vitalità.

Analisi morfologia cellulare

A diversi tempi durante la coltura in terreno di espansione (dal giorno 1 al giorno 15) le cellule sono state raccolte su vetrino mediante citocentrifugazione a 1500 rpm per 8 min e fissate in metanolo-acetone (1:1) a -20°C. I vetrini sono stati quindi lavati in SSC 2X. Si è quindi proceduto alla colorazione dei vetrini con Propidio Ioduro (diluizione 1:300 in SSC 2X), mezzo di montaggio

pronto per l'uso con Propidio Ioduro (Vector Laboratories) o con 4',6-Diamidino-2-fenilindolo cloridrato (DAPI) (Vector Laboratories), e osservati al microscopio UV.

Analisi FACS

Le cellule sono state caratterizzate per la presenza dell'antigene di superficie CD36 e di altri antigeni di superficie cellulare mediante analisi FACS usando lo strumento Beckman Coulter cytomics FC500.

Le cellule staminali CD34⁺ e le cellule in coltura in via di differenziamento ai giorni 1, 4 e 8 in terreno di espansione sono state analizzate per la presenza dell'antigene di superficie CD36, utilizzando l'anticorpo anti-CD36 coniugato con FITC (IOTest Beckman Coulter).

Inoltre le cellule CD34⁺ indifferenziate, le cellule CD34⁺ differenziate (dette CD36⁺) e la linea cellulare UT7/Epo-S1 sono state analizzate per la presenza degli antigeni di superficie caratteristici dei sistemi permissivi alla replicazione del Parvovirus B19. A questo scopo sono stati utilizzati anticorpi coniugati con Ficoeritrina PE (BD BioSciences Pharmigen), l'anti-Glicoforina A (CD235a) coniugato con PE (BD BioSciences), l'anti-CD33 coniugato con FITC (BD BioSciences), l'anti-globoside (Metraya) e l'anticorpo secondario FITC-conjugated goat anti-rabbit Ig's (BioSource).

Circa 500.000 cellule in un volume di 100 µl sono state centrifugate, lavate con terreno fresco e incubate con 5 µl di anticorpo per 30 minuti in ghiaccio (anticorpo primario o anticorpo primario seguito da secondario). Il volume cellulare è stato portato a 500 µl con AMEM e analizzato al FACS.

Saggio di infezione

A diversi time-point (giorno 8 e giorno 14) dopo l'inizio della coltura in terreno di espansione, le cellule CD36⁺ sono state infettate con diluizioni seriali (da 10⁻² a 10⁻¹⁰) di plasma V1 ad alto titolo virale (2 X 10¹² ge/ml di B19V). L'infezione è stata effettuata in una piastra a 96 pozzetti con 10 µl di cellule contenenti 2 x 10⁴ cellule e 10 µl di una definita diluizione di virus. Le cellule sono state incubate per 2 ore a 4°C, espanse in 80 µl di terreno di espansione e incubate a 37° C con il 5% di CO₂. La stessa prova è stata effettuata per la linea cellulare UT7/Epo-S1, come controllo.

Analisi del DNA

A diversi timepoint post-infezione (dal giorno 0 al giorno 5) il DNA è stato estratto dalle cellule infettate CD36⁺ e UT7/Epo-S1 mediante QIAmp DNA mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA).

Il DNA estratto è stato sottoposto a un saggio di real-time PCR quantitativa usando lo strumento Chromo4 Real Time Detector (Bio-Rad). L'analisi è stata effettuata mediante il sistema Quantitect

Probe PCR (Qiagen). La reazione di amplificazione è avvenuta in un volume finale di 25 µl con 0,4 µM di primer e 0,2 µM di sonda, le cui sequenze sono di seguito descritte:

	PRIMER
J35-2591F	TACCTGTCTGGATTGCAAAGC
J35-2791R	GATGGGTTTTCTAGGGGATTATC

	SONDA
J35 probe	6-FAM-ATG GTG GGA AAG TGA TGA TGA ATT TGC TA-Black Hole Quencher

La reazione è iniziata con l'inattivazione della polimerasi a 95°C per 15 minuti, seguita da 45 cicli di 15 secondi a 94°C e 1 minuto a 60°C.

Lo standard esterno per la PCR real-time quantitativa (qPCR) è stato acquistato dal National Institute of Biological Standards and Control (NIBSC).

Analisi dell'RNA

L'estrazione dell'RNA è stata effettuata sulle cellule CD36⁺ e UT7/Epo-S1 a diversi time-point post-infezione (dal giorno 0 al giorno 5) usando il Kit RNature GeneStripsTM (TurnoCapture RNature).

Lo step successivo è stato la sintesi del corrispondente cDNA, usando 500 ng di random primer (Invitrogen) e come enzima la MMLV RT Polimerasi (Invitrogen) o la Superscript II Reverse Trascrittasi (Invitrogen) in un volume finale di 50 µl.

I campioni di cDNA sono stati analizzati mediante saggio di real-time PCR usando lo strumento Chromo4 Real Time Detector (Bio-Rad). 5 µl di cDNA sono stati amplificati parallelamente in tre diverse reazioni, rispettivamente per i trascritti virali NS e CP e per la β-actina, un gene housekeeping, usando il Kit QuantiTect Probe PCR (Qiagen) in un volume finale di 25 µl. Le sequenze dei primer (concentrazione 0.4 µM) e delle sonde (concentrazione 0.2 µM) utilizzate e il profilo termico della reazione di PCR sono descritte come segue:

	Primer
NS	5'-GTTTTATGGGCCCGCCAAGTA-3'
	5'-ATCCCAGACCACCAAGCTTTT-3'
CP	5'-CCTGGGCAAGTTAGCGTAC-3'
	5'-ATGATCCTTGCAGCACTGTCA-3'
β -actina	5'-GGCACCCAGCACAAATGAAG-3'
	5'-GCCGATCCACACGGAGTACT-3'

	Sonde
NS	FAM 6'-CCATTGCTAAAAGTGTTCCA-BHQ1
CP	FAM-TATGTTGGGCCTGGCAA-TAMRA
β -actina	5'JOE-TCAAGATCATTGCTCCTCCTGAGCGC-3'BHQ

N° Cicli	Temperatura	Tempo
1	95°C	15 min
45	94°C	15 sec
	60°C	1 min

La quantificazione di ogni amplicone è stata effettuata mediante interpolazione con la rispettiva curva degli standard di ogni target (NS, CP, β -actina) costruita con diluizioni seriali del plasmide corrispondente.

Analisi delle proteine

A diversi timepoint post-infezione (dal giorno 0 al giorno 5) le cellule sono state raccolte su vetrini mediante Cytospin (1500 rpm per 8 min) e fissate con metanolo-acetone (-20° C per 10 min) e l'espressione delle proteine è stata analizzata mediante Immunofluorescenza (IF), usando come anticorpo primario differenti diluizioni (1:5000-1:10000-1:50000) di anticorpo monoclonale per la proteina capsidica VP2, clone 521-5D, (Chemicon) in PBS/FCS 10% (incubazione per 1 ora a 37°C) e come anticorpo secondario il FITC-labeled goat anti-mouse Ig's (BioSource) diluito 1:500 in PBS-FCS 10% (incubazione 1 ora a 37°C). I vetrini sono stati osservati al microscopio a fluorescenza.

Trasfezione

A diversi tempi di crescita in terreno di espansione (dal giorno 8 al giorno 14), quando le cellule CD36⁺ presentavano una confluenza tra 3x10⁵/ml e 10⁶/ml, sono state trasfettate con il plasmide pEGFP mediante il sistema di nucleofezione Amaxa (Amaxa Biosystems) con un rapporto di 2 µg di DNA per 2x10⁶ di cellule, usando diverse combinazioni di reagenti e programmi. La stessa prova è stata effettuata usando come DNA input il plasmide contenente il genoma del B19 pB19-M20. La trasfezione è stata effettuata parallelamente sulla linea cellulare UT7/Epo-S1 con le condizioni precedentemente ottimizzate.

Cellule	DNA	Nucleofector Reagent	Programma
UT7/Epo-S1	pEGFP/pB19-M20	R	T-20
CD36 ⁺	pEGFP/pB19-M20	R	T-20
CD36 ⁺	pEGFP/pB19-M20	R	V-001
CD36 ⁺	pEGFP/pB19-M20	V	T-19
CD36 ⁺	pEGFP/pB19-M20	CD34 Prog. Cells	U-08
CD36 ⁺	pEGFP/pB19-M20	Monocytic Cells	Y-001

Dopo la trasfezione, le cellule sono state incubate con 2.5 ml di terreno di espansione a 37°C con 5% di CO₂.

Al fine di monitorare la percentuale di mortalità post-trasfezione, le cellule sono state raccolte a diversi time-point (dal giorno 1 al giorno 4 post-trasfezione), e analizzate mediante Citofluorimetro (Analisi FACS) alla concentrazione di 10⁵ cellule/ml in terreno di espansione.

Il saggio di IF è stato effettuato sulle cellule trasfettate con il clone genomico pB19-M20 seguendo il metodo sperimentale già descritto.

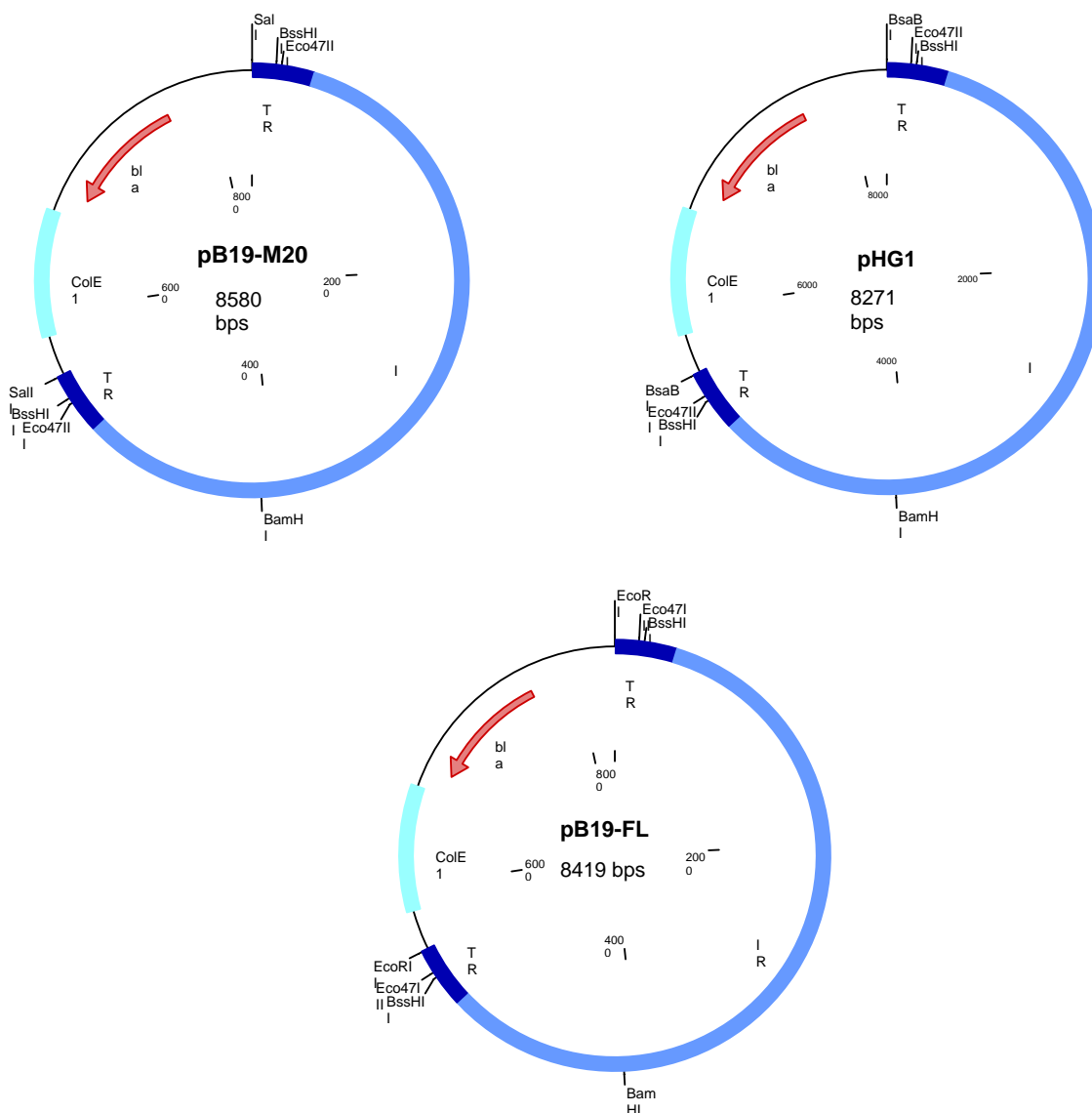
Materiali e Metodi II- Analisi cloni genomici e subgenomici

DNA

Cloni genomici di Parvovirus B19

I cloni genomici di Parvovirus B19 sono stati ottenuti utilizzando come materiali di partenza diversi isolati virali, individuati durante indagini diagnostiche. pB19-M20 è stato costruito dall'isolato J35 (GeneBank AY386330). Il plasmide pB19FL è stato costruito a partire dall'isolato NAN (GeneBank AY504945) e pHG1 dallo strain HV (GeneBank AF162273). I cloni contengono il genoma full-length di Parvovirus B19 inserito in un diverso plasmide, rispettivamente pProEX HTb per pB19-M20, pLITMUS29 per pB19FL, pUC18 per pHG1.

Le mappe dei tre cloni genomici di Parvovirus B19 mostrano gli enzimi Sall, EcoRI, BsaBI che tagliano nel sito di clonazione di ciascun plasmide, Eco47III, la cui posizione indica la configurazione flip/flop dell' hairpin, e BamHI che taglia al nt 4076 nel genoma del B19 e genera le caratteristiche forme replicative.

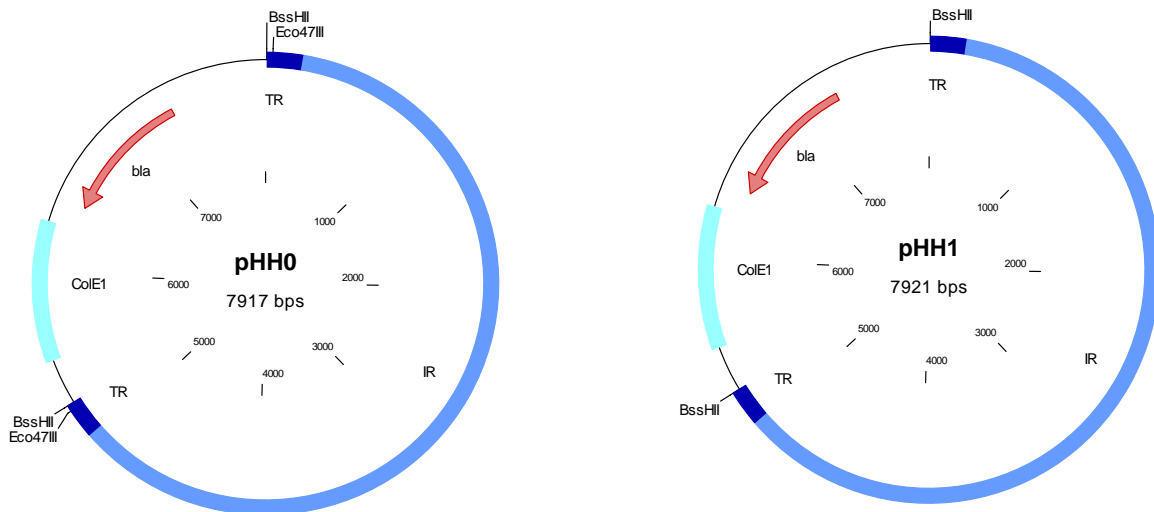


Cloni subgenomici di Parvovirus B19

I plasmidi ricombinanti contengono inserti virali di differente lunghezza , clonati nel vettore plasmidico pUC18.

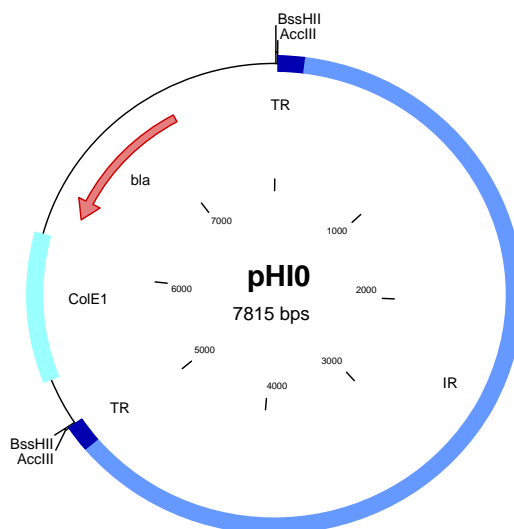
Plasmidi pHH0 e pHH1

I plasmidi pHH0 (7917 bps) e pHH1 (7921 bps) contengono un inserto virale di 5232 bps , clonato mediante l'enzima BssHIII e corrispondente al genoma del B19 con solo una frazione delle TR , tale da includere i punti di simmetria delle stesse (10-208 bps; 5039-5235 bps). I due cloni differiscono per la diversa configurazione dell'hairpin, rispettivamente flop per pHH0 e flip per pHH1.



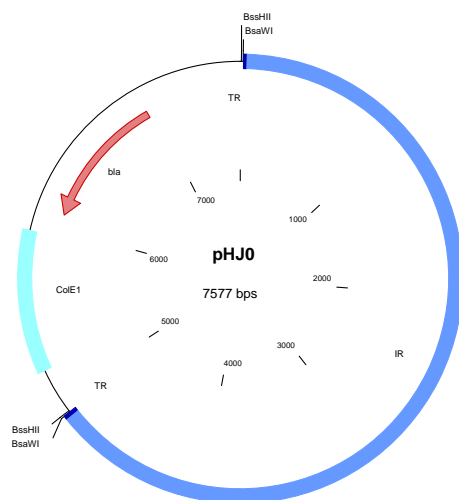
Plasmide pH10

Il plasmide pH10 (7815 bps) contiene un inserto virale di 5108 bps , clonato mediante l'enzima AccIII e corrispondente al genoma virale con una frazione delle TR , ulteriormente ridotta rispetto a pHH0 e pHH1 (3-141 bps; 4972-5108 bps), quindi privato delle sequenze palindromiche originali.



Plasmide pHJ0

Il plasmide pHJ0 (7577 bps) contiene un inserto virale di 4870 bps clonato con l'enzima BsaWI e corrispondente al genoma del B19 quasi del tutto privo delle TR ridotte ai segmenti 3-22 bps e 4853- 4870 bps .



Costrutto sintetico - ccIDNA

Il ccIDNA (covalently closed linear DNA) è un costrutto sintetico che mima un intermedio replicativo del Parvovirus B19. E' stato ottenuto a partire dall'inserto subgenomico HI0 per ligazione con oligonucleotidi sintetici (TRI/TR0) che mimano le forme flip e flop, le due differenti configurazioni , l' una il complemento inverso dell' altra , in cui si possono presentare entrambe le ITR, al 5' e al 3'. Il plasmide pHJ0 è stato sottoposto a digestione con l'enzima di restrizione BspEI per 4 ore a 37 C. L'inserto è stato recuperato dopo corsa elettroforetica e purificato mediante Qiaquick gel extraction kit (Qiagen). Gli oligonucleotidi sintetici TR0 e TR1 sono stati sottoposti a un trattamento termico di 5 minuti a 95 °C, seguito da un'incubazione rapida in etanolo assoluto a 0°C per favorire i legami intramolecolari e renderli simili alle sequenze a forcina del virus. La reazione di ligasi tra l'inserto virale HI0 tagliato con BspEI (isoschizomero dell'enzima AccIII che delimita l'inserto nel backbone plasmidico) e una miscela equimolare degli oligonucleotidi preparati è stata effettuata mantenendo un rapporto molare 1:6 tra inserto e oligonucleotidi sintetici. E' stato utilizzato l'enzima T4 DNA ligasi (NEB) e la reazione è proceduta per 4 ore a 25 °C. Il prodotto è stato poi concentrato mediante precipitazione con etanolo assoluto. La purezza e la concentrazione del campione sono state verificate allo spettrofotometro. Inoltre il ccIDNA è stato controllato con un trattamento a 37 ° C per 30 minuti con Esonucleasi Lambda (NEB), un enzima che taglia frammenti lineari aperti, come l'inserto o frammenti con hairpin non correttamente legati.

TR0 (123 bps)

```
1 ccggaattag ggttggtctt gggccagctt gcttgggggtt gccttgacac
51 taagacaagc ggcgcgccgc ttgatcttag tggcacgtca accccaagcg
101 ctggcccaga gccaaccta att
```

TR1 (123 bps)

```
1 ccggaattag ggttggtctt gggccagcgc ttgggggttga cgtgccacta
51 agatcaagcg gcgcgccgct tgtcttagtg tcaaggcaac cccaagcaag
101 ctggcccaga gccaaccta att
```



Preparazione DNA plasmidico

Le cellule batteriche Supercompetenti Sure 2 (Stratagene) sono state trasformate mediante metodo heat shock con i diversi plasmidi di Parvovirus B19. Una quantità di DNA plasmidico pari a 0,1 ng è stata usata per trasformare 50 µl di cellule. Dopo un'incubazione di 30 minuti in ghiaccio, le cellule sono state sottoposte a shock termico per 45 secondi a 42°C e 2 minuti in ghiaccio; sono stati in seguito aggiunti 200 µl di terreno SOC e si è proceduto a un'incubazione di 1 ora a 37 °C in agitazione. Le cellule batteriche sono quindi state seminate su piastre LB-Agar Ampicillina e le colonie cresciute sono state espanse in terreno liquido LB-Ampicillina (1:1000). Per l'espansione si è deciso di procedere all'incubazione a entrambe le condizioni di temperatura 30°C e 37°C.

Inizialmente, il DNA purificato mediante kit miniprep (Promega e Jetquick) è stato controllato digerendo con lo specifico enzima di restrizione nel sito di clonazione. Inoltre, per valutare l'integrità delle sequenze terminali (hairpin) nel genoma del B19, i cloni full-length sono stati tagliati anche con l'enzima BssHII (sito di taglio al nt 181 e al nt 5411 del genoma del B19 nella regione delle hairpin).

I cloni riconosciuti corretti e stabili sono quindi stati preparati in larga scala mediante purificazione plasmidica con il sistema Endofree Plasmid Maxi Kit (Qiagen). Ogni plasmide è stato poi sottoposto a digestione con l'appropriato enzima di restrizione per escindere l'insero virale. Gli inserti sono stati estratti da gel di agaroso all'1% e purificati mediante cromatografia di affinità con colonnine e/o resina (Qiaex II Gel Extraction Kit e Gel Extraction Kit, Qiagen).

Cellule

Le cellule utilizzate per l'analisi funzionale e strutturale dei cloni genomici di Parvovirus B19 sono state la linea cellulare megacarioblastoide UT7/EpoS-1 e la coltura primaria di cellule progenitrici eritroidi CFU-E CD36⁺.

In entrambi i casi si è proceduto con la trasfezione e infezione delle stesse.

Cellule UT7/Epo-S1

Le cellule UT7/Epo-S1 sono state mantenute in terreno IMDM (Iscove's modified Dulbecco's medium), arricchito con 10% di siero fetale bovino (FCS), 1% penicillina, streptomina, levoglutamina (P/S/G), ed eritropoietina umana ricombinante (EPO) alla concentrazione di 2 U/ml, come fattore di crescita e fatte crescere a 37 °C col 5% di CO₂.

Cellule CD36⁺

La coltura primaria omogenea di progenitori eritroidi CFU-E, ottenuta secondo il metodo descritto nella parte precedente, è stata mantenuta in coltura in terreno di espansione, arricchito di fattori di crescita, a 37°C col 5% di CO₂.

Trasfezione

La trasfezione è stata effettuata mediante nucleofezione utilizzando il sistema Amaxa (Amaxa Biosystems).

Le condizioni di nucleofezione sono state precedentemente ottimizzate. Per la linea cellulare UT7/Epo-S1 si è utilizzato il Reagente R e il programma T20, per le CD36⁺ il Reagent V e il programma T19.

Le cellule sono state inizialmente centrifugate a 1000 rpm per 5 minuti, lavate con PBS e ulteriormente centrifugate. Il pellet ottenuto è stato risospeso in 100 µl di reagente di nucleofezione. Il volume cellulare è stato trasferito in cuvetta nella quale sono stati aggiunti 2 µg del corrispondente inserto plasmidico o del costrutto ccdDNA. Le cellule sono state quindi nucleofettate e successivamente sono stati aggiunti 0.5 ml di terreno preriscaldato. Gli 0.6 ml totali sono stati trasferiti in piastra contenente 2 ml di terreno preriscaldato. Le cellule trasfettate sono state incubate a 37°C per 48-72 ore.

Preparazione lisato cellulare da cellule trasfettate

Le cellule trasfettate con i diversi cloni sono state raccolte a 48/72 ore post-trasfezione. Ogni pellet è stato risospeso in 300 µl di terreno e lisato mediante 3 cicli di congelamento/scongelamento. Ogni lisato è stato quindi sottoposto a centrifugazione per 10 minuti a 10000 g; il surnatante è stato recuperato e trattato con Rnasi A (Invitrogen) alla concentrazione 0,5 mg/ml a 37°C per 3 ore.

Durante l'analisi quantitativa dei cloni genomici e subgenomici, il trattamento del lisato è stato effettuato con DNasi (Roche) e RNasi (Roche) alla concentrazione di 1 U/ μ l, dopo opportuni tentativi di ottimizzazione (di seguito descritti).

Infezione

I lisati digeriti provenienti dalle cellule trasfettate sono stati utilizzati per infettare le cellule, con un rapporto di 10 μ l di lisato e 10 μ l di coltura contenente 2×10^4 cellule in una piastra da 96 pozzetti . L' infezione è proceduta per 2 ore a 4°C. Dopo 2 ore è stato aggiunto a ciascun pozzetto un volume di 80 μ l di IMDM. Metà del numero totale dei pozzetti sono stati riuniti per il primo time point post-infezione. Le cellule contenute negli altri pozzetti sono state espanse in 1 ml di terreno di crescita e incubate per 48-72 ore at 37 °C per le successive analisi.

Come controllo positivo di infezione, 2×10^4 cellule in 10 μ l sono state parallelamente infettate con 10 μ l di virus (VITEX, 6×10^{11} ge/ml) alla diluizione 10^{-3} corrispondente a 10^9 ge.

Durante l'analisi quantitativa dei cloni genomici e subgenomici, l'infezione è avvenuta a 37°C.

Analisi dell'attività infettante dei cloni genomici

I cloni genomici pHG1, pB19-M20 e pB19FL sono stati oggetto di una valutazione comparativa dell'attività infettante.

Analisi del DNA

Il DNA è stato estratto mediante metodo Hirt (Hirt 1967) a 48 ore post trasfezione. Ogni campione è stato digerito in parallelo con gli enzimi EcoRI, (non presenta sito di digestione nel genoma del B19) e BamHI (sito di digestione al nt 4076 del Parvovirus B19). I frammenti risultanti sono stati analizzati mediante Southern Blot: l'elettroforesi di gel allo 0,8% di agarosio è stata seguita da trasferimento a una membrana di nylon (Nylon+, Amersham). La membrana è stata poi ibridizzata con la sonda corrispondente all'intera regione codificante del B19 ³²P-random- primed probe S[himomura et al.,1992] e analizzata mediante PhosphorImager (Molecular Dynamics).

Analisi dell'RNA

Le cellule trasfettate e infettate sono state sottoposte a estrazione dell'RNA. Al fine di estrarre l'RNA totale è stato utilizzato il Trizol Reagent (Invitrogen). L'RNA estratto ai diversi time point (48-72 ore post-trasfezione, 0 ore e 48-72 ore post infezione) è stato quantificato mediante analisi spettrofotometrica. Una quantità pari a 500 ng di RNA per ciascun campione è stata utilizzata come stampo per la sintesi di cDNA usando 500 ng di random primer (Invitrogen) e SuperScript II reverse-transcriptase (Invitrogen).

Un volume di 2.5 µl di cDNA ottenuto dall'RNA totale è stato analizzato mediante PCR per la presenza dei trascritti maturi (dopo splicing) del B19 in un volume finale di 50 µl con 0.4 µM di primer B19-9 e B19-1, Ex Taq Polimerasi (TaKaRa) alla concentrazione di 0.025 U/µl, mix di dNTP (Invitrogen) alla concentrazione di 0.05 mM per ciascuno.

Le sequenze dei primer e le condizioni relative al profilo termico della reazione di PCR sono di seguito riportate:

	Primer
B19-1	5'-CCACGATGCAGCTACAACCTT-3'
B19-9	5'-GTTTTTTTGTGAGCTAACTA-3'

N° Cicli	Temperatura	Tempo
1	94°C	1 min
30	92°C	40 sec
	60°C	40 sec
	75°C	1:30 min
1	75°C	7 min

I 2 ampliconi sono stati visualizzati in un gel al 2.5 % di agarosio (NuSieve Agarose) e bromuro di etidio. Inoltre è stata effettuata un'analisi mediante Southern Blot utilizzando una sonda marcata con fosfatasi alcalina; l'ibridazione è stata seguita da rivelazione con l'utilizzo del substrato CDP-Star (CDP-Star AlkPhos labeling kit, Amersham).

Parallelamente all'estrazione dell'RNA totale, si è proceduto all'estrazione specifica dell'mRNA mediante l'utilizzo del Kit RNature GeneStrips (RNature, Irvine). Il cDNA ottenuto mediante estrazione selettiva dell'mRNA maturo è stato analizzato in real time PCR, utilizzando il Sistema Opticon (Biorad) per la presenza dei trascritti per l'NS e capsidici, mediante il formato Quantitect Probe RT-PCR (Qiagen) utilizzando primer, sonde e seguendo lo stesso profilo termico già descritti per il saggio di infezione delle cellule CD36⁺.

Espressione delle proteine

Analisi degli epitopi conformazionali : immunofluorescenza

Un volume di 50 µl di cellule è stato raccolto mediante cytopspin (1500 rpm per 8 minuti) a diversi time points (48 ore e 72 ore) post trasfezione e post-infezione. I vetrini sono stati fissati in metanolo-acetone (1:1) e usati per il saggio di immunofluorescenza.

L'Immunofluorescenza è stata effettuata usando l'anticorpo monoclonale anti-VP2, clone 521-5D, (Chemicon) diluito 1:500 in PBS-FCS 10% per le UT7/Epo-S1 e 1:50000 per le CD36⁺ e incubato 1 ora a 37 °C ; come anticorpo secondario è stato usato l'anti-mouse-FITC diluito 1:200 in PBS-FCS 10% con Evans Blue (1:200), incubato 1 ora a 37 °C. I vetrini sono stati osservati al microscopio a fluorescenza.

Analisi degli epitopi lineari: Western Blot

Le cellule a 72 ore post-trasfezione sono state pellettate, lisate in condizioni denaturanti e il lisato è stato sottoposto a uno step di denaturazione a 95°C per 5 minuti. Le proteine sono state separate mediante tecnica SDS-PAGE, utilizzando un gel di poliacrilamide al 10%. La corsa elettroforetica è stata seguita da trasferimento su una membrana di nitrocellulosa con pori di 0.45 µm (Protran, Scheicher & Schuell Biosciences) mediante apparato Transblotting semidry (Biorad) a 20 V per 30

minuti. La membrana è stata quindi incubata a temperatura ambiente per 2 ore in blocking buffer, contenente TBS buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4), 5% di proteine del latte e 0.05% Tween 20. L'immunorivelazione è stata effettuata utilizzando, come anticorpo primario, l'anticorpo monoclonale MAB8292 (Chemicon) per la VP (epitopo comune VP1-VP2) diluito 1:2000 in blocking buffer, incubato overnight a 4°C; dopo lavaggi in TBS-Tween 20, è seguita l'incubazione con l'anticorpo secondario, l'anti-mouse-HRP (BD Biosciences Clontech) diluito 1:10000 in blocking buffer, incubato per 1 ora a 4°C. Lo step successivo è stato la rivelazione chemiluminescente utilizzando il SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Pierce). La membrana è stata quindi analizzata al PhosphorImager (Molecular Dynamics).

Analisi strutturale

Sequenziamento DNA

I 3 cloni genomici pB19-M20, pB19FL e PHG1 sono stati sottoposti a digestione con l'enzima di restrizione BssHII (sito di taglio al nt 181 e al nt 5411 nella regione delle hairpin del genoma del B19). I frammenti di DNA ottenuti dalla digestione enzimatica corrispondenti all'intera regione codificante del B19 e a metà della regione delle hairpin sono stati estratti e purificati mediante Qiaex II Gel Extraction Kit (Qiagen). Si è proceduto all'amplificazione utilizzando il kit ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems), aggiungendo a ogni campione di DNA 8 µl di mix di reazione e 0.3 µl di primer. I primer utilizzati per il sequenziamento sono stati primer universal pUCf1, pUCr1, M13 f and M13 r (Invitrogen) indistintamente per tutti e tre i cloni, visto che legavano la regione comune nel vettore plasmidico. Inoltre sono stati utilizzati primer specifici per ciascun clone. Il DNA amplificato è stato sottoposto a purificazione tramite Colonnine Centri-Sep (Princeton) e successivamente sequenziato utilizzando il Sequenziatore ABI PRISM (Applied Biosystems). L'analisi delle sequenze ottenute è stata effettuata mediante l'utilizzo del Software Lasergene (DNASar, Inc., Madison, WI).

Allineamento Proteine

La struttura primaria, corrispondente alla sequenza aminoacidica delle proteine virali codificate dai tre cloni genomici pB19-M20, pB19FL, pPHG1, è stata analizzata in parallelo utilizzando i software CloneManager e Lasergene (DNASar).

Studio della regione VP1 unica

Clonazione della regione VP1 unica

Il DNA codificante per la regione VP1 unica (681 bps, da 2624 a 3305 nell'isolato J35) è stato clonato a partire dai tre cloni genomici wild type (pB19-M20, pB19FL, pHG1), seguendo una strategia di clonazione precedentemente descritta [Lu et al., 2006]. Una reazione di PCR è stata effettuata a partire dai diversi DNA stampo utilizzando come DNA Polimerasi l'enzima Platinum Pfx (Invitrogen), e i primer e le condizioni di amplificazione descritti.

L'amplicone di 685 nucleotidi (681 basi della VP1u con l'aggiunta di 4 basi CACC) è stato utilizzato per una reazione di ligasi in vitro nel vettore pET (pET 101/D-TOPO) tramite il sistema Champion pET directional TOPO Expression Kit (Invitrogen). Il plasmide ottenuto è stato utilizzato per la trasformazione di cellule batteriche. I cloni sono stati analizzati mediante digestione con gli enzimi di restrizione XbaI e SacI (enzimi presenti nel sito di clonazione), e l'enzima SapI (per valutare il corretto orientamento dell'inserito nel vettore plasmidico). La conferma della corretta clonazione è stata effettuata mediante sequenziamento secondo il protocollo già descritto, utilizzando i primer riportati e i primer T7-f e T7-r forniti dal kit.

	Primer clonazione VP1u
VP1u-f	5'- CACCATGAGTAAAGAAAGTGGCAAATG -3'
VP1u-r	5'- GCTTGGGTATTTTTCTGAG -3'

N° Cicli	Temperatura	Tempo
1	94°C	3 min
40	94°C	15 sec
	52°C	30 sec
	68°C	4 min
1	68°C	40 min

	Primer sequenziamento cloni VP1u
516-f	5'- GGACTGTAGCAGATGAAGAG -3'
312-r	5'- GGTTCTGCATGACTGCTACTG -3'

Mutagenesi sito-specifica VP1u

L'analisi di mutagenesi è stata effettuata mediante il kit QuickChange Site-Direct Mutagenesis Kit (Stratagene) al fine di inserire una mutazione puntiforme nel clone genomico pB19-M20 (nt 3149 del genoma del B19 per pB19-M20, nt 3148 per pB19FL) e nel clone subgenomico pM20pET per la regione VP1 unica (nt 530 del clone VP1u , corrispondente al nt 526 della VP1 del B19). La mutazione puntiforme ha riguardato la sostituzione di una A al posto di una G, corrispondente alla sostituzione dell'aminoacido lisina (K) al posto di acido glutamico (E), nella posizione aminoacidica 176 della regione VP1 unica, e precisamente nel motivo della fosfolipasi A₂ all'altezza del sito catalitico. L'analisi di mutagenesi nel clone genomico pB19-M20 è stata effettuata subclonando la regione da mutagenizzare nel vettore pBluescript II SK+ (Stratagene), riinserendo il frammento mutagenizzato nel clone originario e generando così un clone genomico del B19 mutato. Non è stato necessario applicare tale strategia per mutagenizzare il clone VP1u pM20pET dal momento che quest'ultimo non presenta le regioni delle hairpin responsabili dell'instabilità. I primers e le condizioni termiche della reazione di PCR per la mutagenesi sito-specifica sono descritti. I mutanti corretti sono stati controllati e individuati mediante sequenziamento con il metodo già descritto, con opportuni primer .

	Primer mutagenesi VP1u
forward	5'- CCATATACTCATTGGACTGTAGCAGATAAAGAGCTTTTA -3'
reverse	5'-TAAAAGCTCTTTATCTGCTACAGTCCAATGAGTATATGG -3'

N° Cicli	Temperatura	Tempo
1	95°C	30 sec
15	95°C	30 sec
	55°C	1 min
	68°C	6 min

	Primer sequenziamento mutanti VP1u
VP1u-399f	5'- GGCCTGGCAATGAGCTACAA -3'
VP1u-672r	5'- TCTGAGGCGTTGTAAGC -3'

Attività infettante del clone genomico mutante

Il clone genomico mutante del B19 (chiamato pM20-FL) è stato utilizzato in un saggio di infezione nella linea cellulare UT7/Epo-S1 e nella coltura primaria di cellule CD36⁺. L'analisi degli acidi nucleici e delle proteine è stata effettuata seguendo la stessa procedura descritta per l'analisi dell'attività infettante dei cloni genomici wild type.

Espressione della VP1 unica

I cloni VP1u wild type e il clone VP1u mutante, ottenuto dal pB19-M20 (chiamato pM20pET-FL) sono stati utilizzati per esprimere grandi quantità di proteina ricombinante in cellule di Escherichia Coli BL21 (fornite dal kit Champion pET directional TOPO Expression, Invitrogen). Le cellule batteriche sono state trasformate parallelamente con i diversi cloni e la sintesi della proteina è stata indotta con 1 mmol/L di isopropil- β -D-1-tiogalattopiranoside (IPTG, Fermentas) per 5 ore. Le cellule sono quindi state lisate mediante l'utilizzo del BugBuster Protein Extraction Reagent (Novagen), con l'aggiunta di lisozima (Novagen) e della nucleasi benzonasi (Novagen); la proteina contenuta nel surnatante è stata purificata mediante His Bind Kits (Novagen), dializzata in TBS (Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes, Pierce), concentrata (Centriplus concentrator, 10 KDa exclusion limit; Amicon) e quantificata mediante il metodo Bradford e l'analisi spettrofotometrica usando il Micro BCA protein assay Kit (Pierce).

Le proteine così ottenute sono state analizzate su un gel di polyacrilamide al 10%. Alla corsa elettroforetica è seguita la colorazione del gel col Coomassie Blue staining e l'analisi in Western Blot, seguendo la procedura già descritta per l'analisi dell'attività infettante, e usando come anticorpo primario l'anticorpo monoclonale per l'epitopo V5 (tag della proteina ricombinante), coniugato con l'enzima perossidasi (HRP).

Analisi dell'attività fosfolipasica

Le proteine ricombinanti ottenute dai cloni della regione VP1 unica wild type e dal clone mutante, rispettivamente pM20pET, pB19FLpET, pHG1pET and pM20pET-FL sono state analizzate per investigare l'attività catalitica del motivo della PLA₂, mediante l'utilizzo di un metodo colorimetrico (Colorimetric assay sPLA₂ activity Kit, Cayman Chemical). Come controllo positivo è stata usata una proteina ricombinante precedentemente prodotta e già testata per tale attività enzimatica [Lu et al., 2006]. Il segnale colorimetrico è stato misurato ogni minuto per 10 minuti a 405 nm di densità ottica.

Analisi di mutagenesi

E' stata effettuata un'analisi di mutagenesi nel genoma del B19 a partire dal clone genomico full-length pB19-M20.

I diversi mutanti per le diverse proteine virali sono stati costruiti mediante mutagenesi sito-specifica col sistema QuickChange Site-Directed Mutagenesis (Stratagene), seguendo il protocollo utilizzato per la mutagenesi sito-specifica della regione VP1u (descritta precedentemente).

Vista l'instabilità delle ITR, non è stato possibile procedere alla mutagenesi del plasmide full-length contenenti le sequenze delle hairpin intatte. I frammenti di interesse del genoma del B19, relativi alla parte da mutagenizzare, sono stati digeriti con opportuni enzimi di restrizione e subclonati dal clone genomico nel vettore plasmidico pBlueScript II KS+(Stratagene). E' seguita la reazione di PCR con gli opportuni primer per inserire la mutazione desiderata e dopo controllo dell'avvenuta mutagenesi gli inserti sono stati reinseriti nel clone pB19-M20.

Le mutazioni hanno portato all'introduzione di uno stop-codon al posto di un codone di inizio o nell'open reading frame delle diverse proteine virali, cosicché ciascun mutante ha causato knock-out della proteina in questione del B19.

Il plasmide N8 è un mutante di delezione, essendo privo di parte delle hairpin.

Le posizioni dei nucleotidi sono basate sul genoma J35 (GeneBank AY386330). La tabella seguente indica le varie mutazioni introdotte sul genoma del B19.

Plasmide	Target mutazione	Cambiamento nella sequenza nucleotidica	Cambiamento voluto nelle proteine espresse	Contemporaneo cambiamento in altre proteine espresse
pB19M20-N8	ITRs	Delezione del nt. 204 nelle ITR al 5' (1-204) e al 3' (5392-5596) .	No	No
pB19-M20/NS(-)	NS	Digestione con <i>AfIII</i> and fill-in risultato in aggiunta di AATT dopo il nt.757	Mutazione Frame shift risultata in un TAA codon. Troncato 54 aa NS	No
pB19-M20/VP1(-)	VP1	G2633T	da ATG a ATT; No espressione VP1	No
pB19-M20/VP2/(-)	VP2	A3305T & T3306A	da ATG a TAG No espressione VP2	Proteina VP1 troncata (VP1u espressa)
pB19-M20/7.5 (-)	7.5-kDa protein	A2084T & T2085A	da ATG a TAG No espressione 7.5-kDa	N490I in NS
pB19-M20/X(-)	ORF X	A2874 T & T2875A	ATG to TAG No espressione proteina X	H84L in VP1
pB19-M20/11(-)	11-KDa protein	A4917T & T4918A	ATG to TAG No espressione 11-kDa	Y765L in VP1 o Y538L in VP2

I vari mutanti insieme al controllo wild type pB19-M20 sono stati utilizzati in un saggio di trasfezione e di infezione come già descritto e analizzati per la replicazione del DNA virale mediante Southern Blot dopo digestione con l'enzima BamHI , la sintesi degli RNA messaggeri maturi mediante RT-PCR (metodi descritti) e l'espressione delle proteine capsidiche mediante microscopia confocale.

Analisi quantitativa cloni genomici e subgenomici

I cloni genomici e subgenomici descritti sono stati sottoposti ad analisi di espressione delle proteine e quantificazione degli acidi nucleici. Nel corso di questa analisi, è stato studiato anche il plasmide pHG0 il genoma full-length del B19, ma in una diversa configurazione delle hairpin (flop) rispetto a pHG1 (flip). Al fine di una corretta quantificazione degli acidi nucleici neoformati dopo infezione con il lisato proveniente da cellule trasfettate sono state effettuate varie prove di digestione del lisato ottimizzando il protocollo già noto e applicato. Il lisato è stato sempre ottenuto come già descritto alle 48 h dopo trasfezione e per HG1 si è proceduto alla digestione con DNasi e RNasi in diverse combinazioni di enzimi e tempi alla temperatura di 37°C, come segue nella tabella:

	Enzima	Tempo	Enzima	Tempo
1	no			
2	RNasi (Ambion)	overnight		
3	DNasi (Roche)	overnight		
4	DNasi (Roche) + RNasi (Ambion)	overnight		
5	RNasi (Ambion)	overnight	DNasi (Roche)	overnight
6	DNasi (Roche)	overnight		
7	DNasi (Roche)	overnight	RNasi (Ambion)	3 h
8	DNasi (Roche)	overnight	RNasi (Ambion)	overnight
9	RNasi (Ambion)	overnight	DNasi	3 h
10	no			
11	DNasi (Roche)	4 h		
12	RNasi (Roche)	4 h		
13	DNasi (Roche)	4 h	RNasi (Roche)	4 h
14	DNasi (Roche) + RNasi (Roche)	4 h		

Analisi delle proteine

Immunofluorescenza

E' stata effettuato un saggio di immunofluorescenza, secondo il metodo già descritto, sulle cellule a 48 ore dopo la trasfezione.

Microscopia elettronica

Una quantità di cellule pari a 50000 a 48 h post trasfezione è stata raccolta e fissata in glutaraldeide per la successiva analisi in microscopia elettronica a trasmissione.

Estrazione del DNA

I pellet cellulari relativi ai prelievi post-trasfezione, ai lisati utilizzati come input per l'infezione e ai campioni post-infezione, sono stati risospesi in 500 µl di Buffer di lisi (100 mM di NaCl , 10mM TrisCl pH 7,5 , 10 mM EDTA , 1% SDS) a cui sono stati aggiunti 5 µl di Proteinasi K (100 µg/ml). Dopo un'incubazione a 50°C per 1 ora, sono stati aggiunti 500 µl di fenolo cloroformio:alcol isoamilico (Sigma); il volume di reazione è stato lasciato 5 minuti in incubazione e centrifugato a 13000 rpm per 5 minuti . La fase acquosa è stata sottoposta a due successive estrazioni per aggiunta di 500 µl di cloroformio e ulteriore incubazione di 5 minuti e centrifuga a 13000 rpm per 5 minuti . Gli acidi nucleici sono stati precipitati per aggiunta alla fase acquosa di 1 ml di etanolo assoluto e 50 µl di NaAcetato 3 M pH 5,5 ; dopo un' incubazione di 15 minuti a -70°C, i campioni sono stati centrifugati a 13000 rpm a 4°C per 15 minuti; il pellet è stato lavato con etanolo al 70% e risospeso in 50 µl di H₂O sterile.

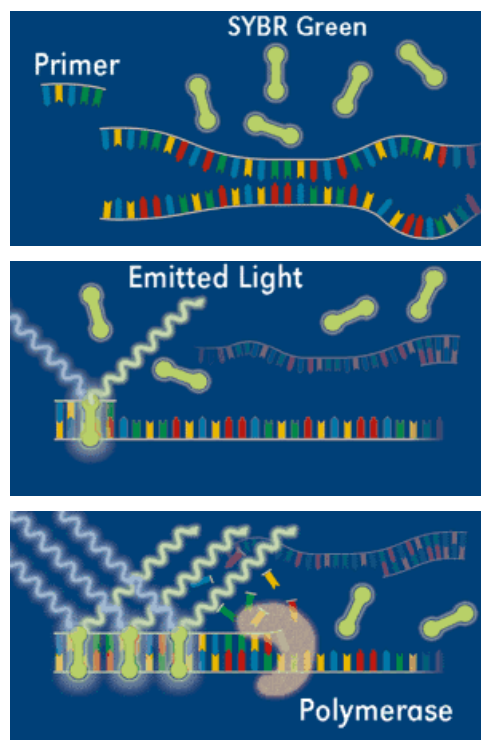
Estrazione dell'RNA

L'estrazione degli RNA è stata effettuata mediante ToTally RNA kit (Ambion) sui campioni relativi alle 2 ore e 48 ore post-trasfezione, lisato input, 2 ore 2 48 ore post-infezione. Gli RNA totali sono stati risospesi in 50 µl di H₂O sterile.

Real Time PCR

Per il saggio Real Time PCR è stato utilizzato lo strumento Rotorgene (CORBETT Research) e il monitoraggio della reazione di amplificazione è stato condotto mediante rilevazione del segnale di fluorescenza emessa dal fluorocromo SybrGreen che si intercala nelle molecole bicatinarie di DNA che si vanno progressivamente accumulando:

Rilevazione mediante SybrGreen



L'amplificazione è stata condotta utilizzando il sistema QuantiTectSYBRgreen PCR (Qiagen) . L'acquisizione della fluorescenza avviene ad ogni ciclo al termine dello step di elongazione. Per l'analisi del DNA virale, 5 µl di campione purificato, corrispondente a una quantità pari a 30.000 cellule, sono stati amplificati con l'uso di una coppia di primer contigui, Coppia 2, il cui prodotto di amplificazione corrispondente ha una lunghezza di 146 bps; il volume totale di reazione è stato di 20 µl di reazione contenenti 10 µl di Master Mix 2X e 1µl di primer (0,5 µM). La sequenza dei primer e il programma di amplificazione sono di seguito descritti:

	Primer Coppia 2
2210 senso	5'- CGCCTGGAACACTGAAACCC -3'
2355 antisenso	5'- GAAACTGGTCTGCCAAAGGT -3'

Step	Temperatura	Tempo	Slope (°C/sec)	n° cicli
attivazione iniziale	95°C	15 min	20	1
denaturazione	94°C	15 sec	20	50
annealing	55°C	30 sec	20	
elongazione	72°C	30 sec	20	
melting	95°C	0 sec	20	1
	65°C	0 sec	20	
	95°C	0 sec	0.1	
raffreddamento	30°C	30 sec	20	

Preparazione del bersaglio a DNA HR0

Il plasmide pHR0 è stato usato per trasformare cellule E.Coli DH5 α (Invitrogen). Il DNA plasmidico è stato purificato mediante cromatografia di affinità e sottoposto a ripetuti cicli di filtrazione mediante filtri MICROCON (Millipore).

Il plasmide purificato è stato amplificato in PCR con una coppia di primer universali (pUC-f1: 5'-CACACAGGAAACAGCTATGA-3'; pUC-r1:5'-TTCCCAGTCACGACGTTGTA-3') che si legano ai vettori di clonazione in posizione esterna rispetto all' insertoHR0.

Per amplificare l'inserto virale HR0 è stato utilizzato l'enzima Expand High Fidelity (Roche): 10 ng di pHR0 sono stati aggiunti ad una miscela di amplificazione contenente 5U di enzima, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 0.3 μ M primer universali.

Le condizioni di amplificazione applicate sono riportate:

Step	Temperatura	Tempo	N° cicli
denaturazione iniziale	95°C	5 min	1
denaturazione	95°C	30 sec	10
annealing	55°C	30 sec	
elongazione	68°C	3 min	
denaturazione	95°C	30 sec	20
annealing	55°C	30 sec	
elongazione	68°C	3 min + 5 sec/ciclo	
elongazione finale	68°C	7 min	1

Il prodotto di amplificazione (HR0) è stato purificato mediante cromatografia di affinità su matrice di silicati (QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN). La concentrazione e la purezza del DNA sono state determinate con analisi spettrofotometriche ed elettroforetiche. Sono quindi state preparate diluizioni scalari da usare come standard di numero di copie genomiche nelle reazioni di amplificazione.

Real time RT-PCR

Gli RNA virali sono stati analizzati utilizzando il sistema QuantiTectSYBRgreen RT-PCR (Qiagen). I primer utilizzati per la reazione di RT-PCR sono una coppia di primer a ponte (517b/2317), specifica per l'amplificazione dell'RNA maturo relativo alla proteina capsidica VP1 (amplificato di 244 bps). La coppia a ponte è costruita in modo che le prime 15-16 basi si leghino al primo esone, definito sequenza leader, mentre le restanti 4-5 basi non si appaiano all'introne, ma sono specifiche per la sequenza del secondo esone:



	Primer a ponte
547c senso	5'- TGAGCTAACTAACAGGCGCC -3'
2317 antisenso	5'- CACGATGCAGCTACAACCTTC -3'

Per l'analisi sono stati utilizzati 5 µl del campione purificato con il ToTally RNA kit (Ambion) ai quali sono stati addizionati 10 µl di RT-Master Mix 2x 0,2 µl di QuantiTect RT Mix , 2 µl di primer in un volume totale di reazione di 20 µl. Il profilo di amplificazione è equivalente a quello relativo all'analisi del DNA con una fase aggiuntiva relativa alla retrotrascrizione iniziale, della durata di 30 minuti alla temperatura di 55°C.

Quantificazione assoluta DNA

I dati di fluorescenza acquisiti sono stati analizzati per ogni clone ai diversi time-point post-trasfezione e post-infezione. Per ogni reazione è stato individuato un valore detto crossing point (Cp), espresso come numero di ciclo di amplificazione corrispondente al punto di intersezione tra la fase esponenziale di accumulo dei prodotti di amplificazione ed un livello di fluorescenza (threshold) fissato arbitrariamente. Il valore di Ct ottenuto per le singole reazioni è funzione del numero di copie bersaglio presenti in partenza. L'efficienza di amplificazione relativa ad ogni singolo campione è stata calcolata dal Software dello strumento.

La quantificazione del DNA virale presente in ogni campione è stata effettuata mediante interpolazione su una retta ottenuta dall'amplificazione di concentrazioni scalari del bersaglio HR0.

Quantificazione relativa RNA

La quantificazione dell'RNA virale è stata effettuata per utilizzo della seguente formula:

$$\text{ratio} = C_t(DNA) / C_t(RNA)$$

in cui $C_t(DNA)$ e $C_t(RNA)$ sono i valori di crossing point relativi al segnale del DNA e dell'RNA per ogni determinato campione.

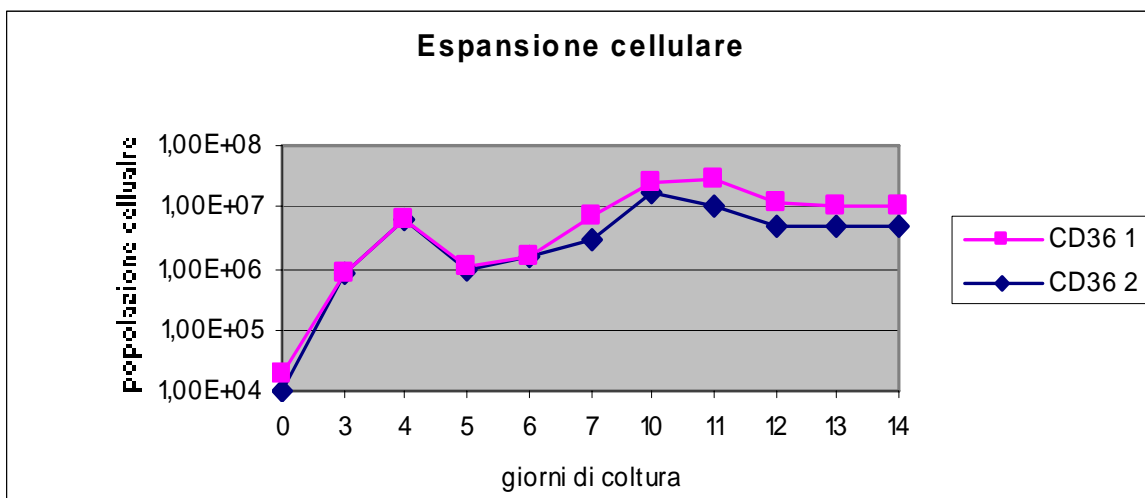
L'efficienza di amplificazione relativa ad ogni singolo campione è stata calcolata dal Software dello strumento.

Risultati I- Generazione di cellule CD36⁺

Coltura cellulare

La crescita delle cellule CD34⁺ è stata seguita giornalmente. Le cellule sono state prima coltivate in terreno di mantenimento visto che dopo il ciclo congelo/scongelo presentavano vitalità molto bassa. Durante la coltura delle cellule in terreno di mantenimento, la mortalità osservata è stata fino al 90-95%. Al quarto giorno in terreno di mantenimento, 10⁴ cellule/ml sono state coltivate in terreno di espansione.

Quando la densità cellulare ha raggiunto approssimativamente 1-2x10⁶/ml, le cellule sono state ridotte a una concentrazione di circa 1-5x10⁵/ml. Questo ha permesso alla coltura di essere mantenuta in un ambiente dove citochine e fattori di crescita non fossero mai in esaurimento. Seguendo la crescita delle cellule in terreno di espansione, a partire dal giorno 0, è stato osservato un aumento esponenziale tra il giorno 4 e il giorno 11.



La coltura delle cellule CD34⁺ differenziate nel terreno IMDM arricchito (terreno UT7/Epo-S1) non ha mostrato buoni risultati, e le UT7/Epo-S1 non hanno mostrato maggiore permissività in terreno di espansione delle CD34⁺.

Analisi morfologia cellulare

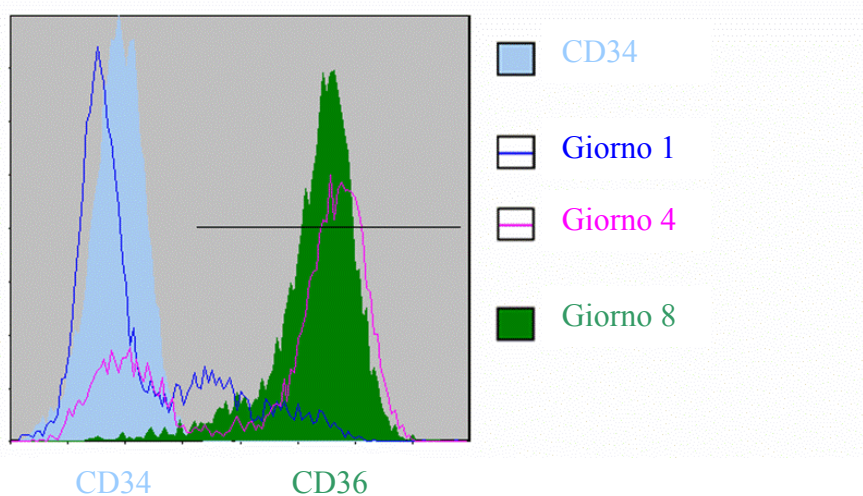
Per verificare lo stato delle cellule e la forma del nucleo, i vetrini contenenti cellule fissate da diversi giorni in coltura, sono stati colorati con Propidio Ioduro o DAPI, che legano selettivamente il DNA, e osservati al microscopio UV. Sono state osservate cellule dal giorno 1 al giorno 15 in

terreno di espansione ed è risultato che dopo 2 settimane di coltura, il nucleo appariva più piccolo e le cellule in condizioni non ottimali, suggerendo uno stato di differenziamento più tardivo.

Analisi FACS

L'analisi al FACS ha confermato la purezza e il completo differenziamento delle cellule CD34⁺ in cellule CD36⁺.

L'esperimento con gli anticorpi anti-CD34 e anti-CD36 è stato effettuato sulle cellule CD34⁺ indifferenziate e sulla coltura in via di differenziamento. Al giorno 8 quasi il 100% delle cellule sono CD36⁺.



Inoltre l'analisi al FACS ha confermato che le cellule CD36⁺ differenziate sono del lineage eritroide ed esprimono, come le UT7/Epo-S1, il recettore del B19, il globoside P e la glicoforina sulla superficie cellulare, mentre le cellule CD34⁺ parentali non esprimono nessuno di questi antigeni critici tipici dei sistemi cellulari permissivi all'infezione da B19.

La tabella seguente indica la percentuale di cellule positive per gli antigeni di superficie cellulari.

Antigene di superficie	CD34+	CD36+	UT7/Epo-S1
Glicoforina A	0.3	63.9	26.6
Globoside	4.7	99.1	57.6
KU80	NT	0.0	1.9
CD10	0.0	0.0	0.0
CD19	0.1	0.0	0.0
CD2	0.9	0.0	0.0
CD3	0.1	0.0	0.0
CD33	46.2	58.6	91.3
CD34	96.6	1.0	0.0
CD36	11.1	97.9	99.0
CD44	98.9	98.0	99.0
CD49e	NT	17.7	29.6
CD71	NT	97.0	96.5

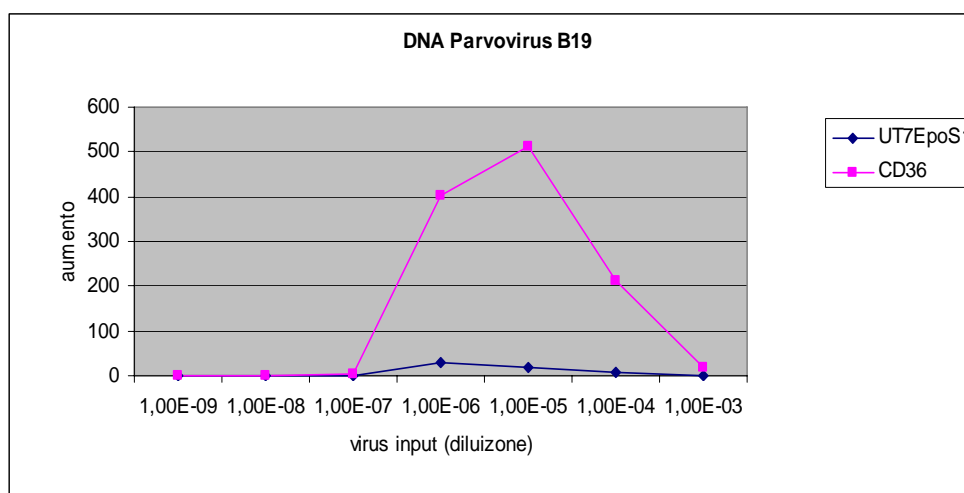
Saggio di infezione

Il saggio di infezione delle cellule CD36⁺ con diverse quantità di B19V è stato effettuato a diversi tempi in terreno di espansione. I risultati ottenuti in PCR e IF suggeriscono che l'intervallo di tempo tra il giorno 8 e il giorno 11 è il miglior momento per generare la quantità di virus più alta.

Analisi del DNA

Gli estratti di DNA sono stati analizzati mediante PCR real time al fine di confrontare la permissività delle cellule CD36⁺ con quella già testata della linea cellulare UT7/Epo-S1.

E' risultato un aumento del DNA virale post infezione di circa 500 volte per le cellule CD36⁺ rispetto alle UT7/Epo-S1. Nonostante la sensibilità del saggio sia confrontabile per entrambi i tipi di cellule (diluizione 10⁻⁷ di VITEX corrispondente a 10⁵ copie), la quantità di virus output nelle cellule CD36⁺ è molto più alta ed è rivelabile quando l'infezione è effettuata con diluizioni di virus tra 10⁻⁵ e 10⁻⁶. Il grafico illustra l'aumento del DNA del B19 in funzione della quantità di virus.

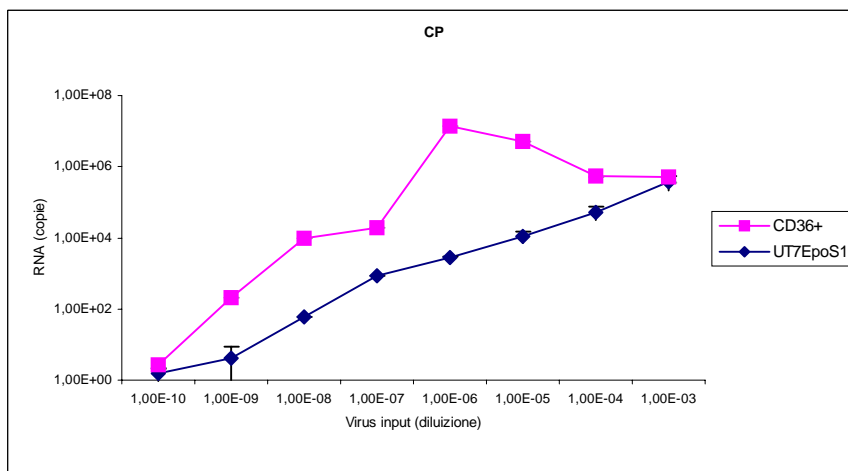
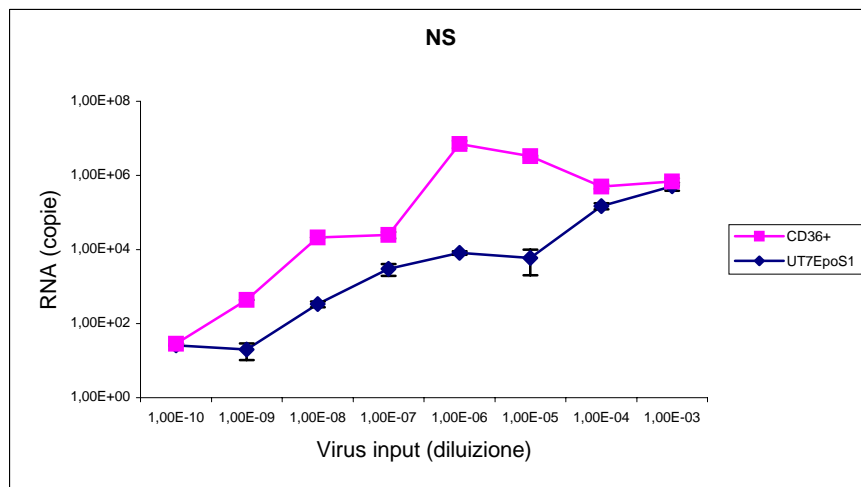
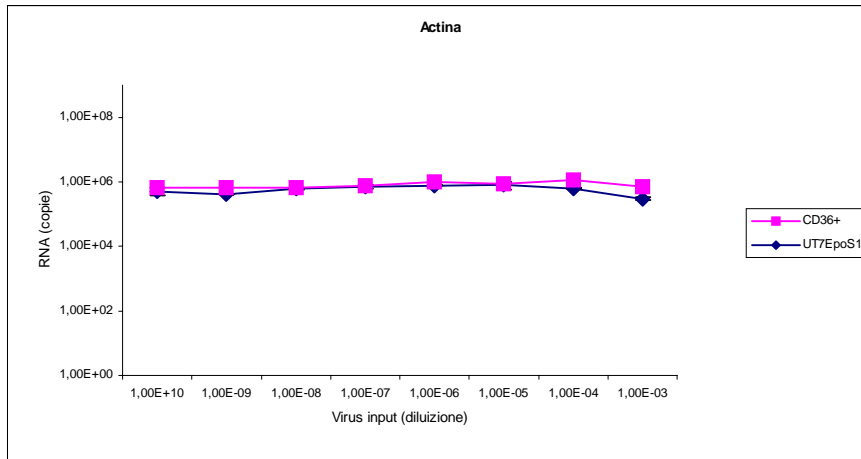


Analisi dell'RNA

Il metodo di estrazione RNature è stato selettivo per gli RNA messaggeri.

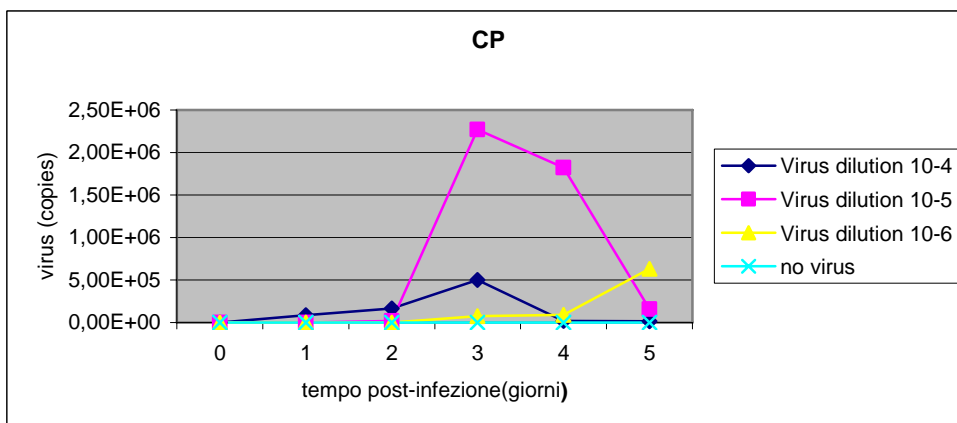
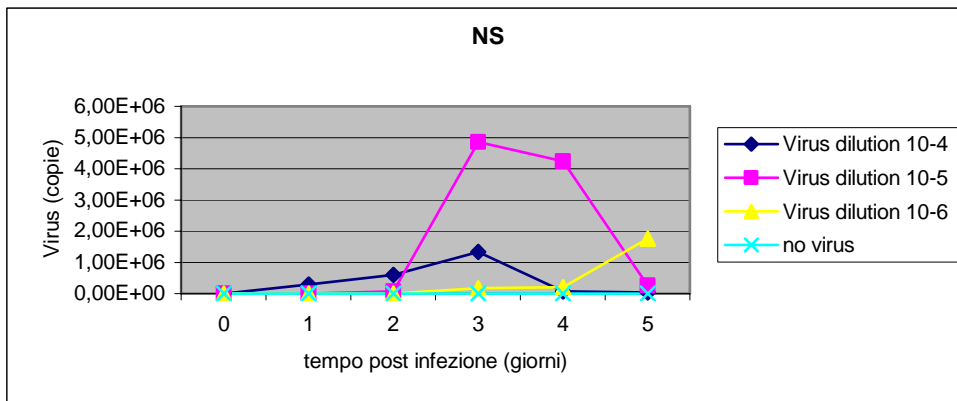
La reazione di real time RT-PCR è stata effettuata per quantificare i trascritti nelle cellule CD36⁺ in confronto alle UT7/Epo-S1.

E' stata osservata la stessa efficienza nell'estrazione dell'RNA, come suggerisce lo stesso numero di cellule per le UT7/Epo-S1 e per le CD36⁺ nel grafico dell'actina. Entrambi i trascritti corrispondenti alle proteine non strutturali e capsidiche (NS and CP rispettivamente) sono significativamente più alti nelle CD36⁺.



Inoltre le cellule CD36⁺ hanno mostrato la massima quantità di RNA quando infettate con diluizioni più alte di virus (10^{-5} - 10^{-6} corrispondenti a 10^6 - 10^5 copie), mentre per le UT7/Epo-S1 l'aumento è quasi esponenziale con la quantità di virus input utilizzata.

Abbiamo confrontato il saggio di infezione delle cellule CD36⁺ con diverse diluizioni di virus e analizzato i trascritti a diversi time-point post-infezione. I grafici mostrano che il miglior momento per analizzare i trascritti è il giorno 3.

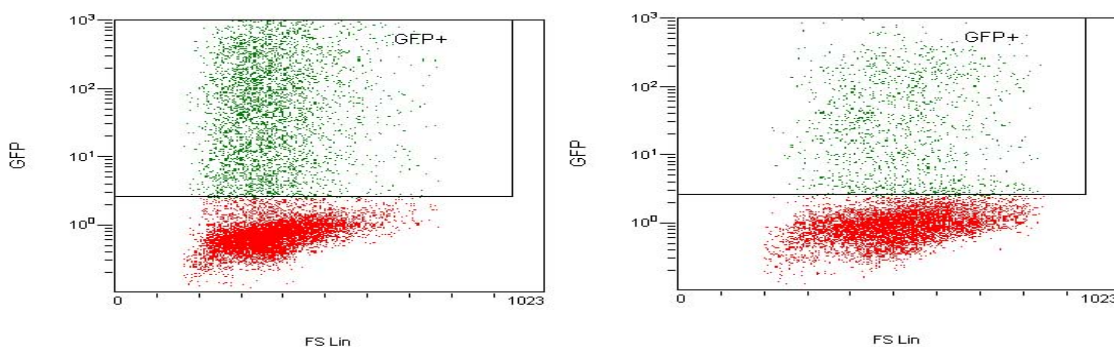


Analisi delle proteine

E' stata effettuata parallelamente per le UT7/Epo-S1 e le CD36⁺ la prova di immunofluorescenza per la ricerca dell'espressione delle proteine capsidiche del B19 a diversi time-point (dal giorno 0 al giorno 5 post infezione). E' stato osservato che l'end-point in IF è la diluizione di virus 10^{-6} , corrispondente a 10^6 copie, per le cellule CD36⁺, rispetto a 10^{-3} , corrispondente a 10^9 copie, osservate nelle UT7/Epo-S1. Sono stati osservati 3 logaritmi di sensibilità in più in IF per le cellule CD36⁺. Inoltre è stato osservato che il tempo ottimale per l'analisi dell'espressione delle proteine è il giorno 2, anche se è stato possibile trovarle fino al giorno 5.

Trasfezione

Le cellule CD36⁺ trasfettate con pEGFP sono state analizzate mediante Citofluorimetro (Analisi FACS) a diversi time-point (dal giorno 1 al giorno 4 post-trasfezione). La vitalità e la positività all'espressione del plasmide GFP dipendono dal giorno di coltura in cui la trasfezione viene effettuata.



E' risultato che il migliore momento per analizzare le cellule è il giorno 2, visto che al giorno 4 tutte le cellule sono morte. La percentuale di mortalità osservata nelle CD36⁺ più alta di quanto osservato nelle UT7/Epo-S1 (70% vs 50%), visto che le cellule CD36⁺ sono una coltura primaria e non una linea cellulare. Quando le cellule CD36⁺ sono state trasfettate al giorno 8 in terreno di espansione (confluenza a 3×10^5 /ml), una quantità tra il 14% e il 26% (in base alle condizioni utilizzate) è positiva al GFP. Quando le cellule sono state trasfettate al giorno 13 in terreno di espansione, è stato osservato il più grande numero di cellule positive con le condizioni per le cellule monocitarie, rispetto ai giorni 8 e 10. Solo il 9% delle cellule CD36⁺ trasfettate al giorno 14 in terreno di espansione è positivo all'espressione di GFP.

Il miglior momento per trasfettare le cellule CD36⁺ è il giorno 8 in terreno di espansione.

Le cellule CD36⁺ trasfettate con il clone genomico pB19-M20 con diverse condizioni sono state analizzate in IF dopo 48 ore post trasfezione. Il miglior risultato è stato raggiunto con le condizioni Reagente V e programma T19, in cui oltre al 50% delle cellule mostrano positività alle proteine capsidiche del B19, mentre il Reagente R e il Programma T20 (condizioni UT7/Epo-S1) mostra un 40% di positività, e il Reagente per i progenitori CD34 e per le cellule monocitarie circa al 10%.

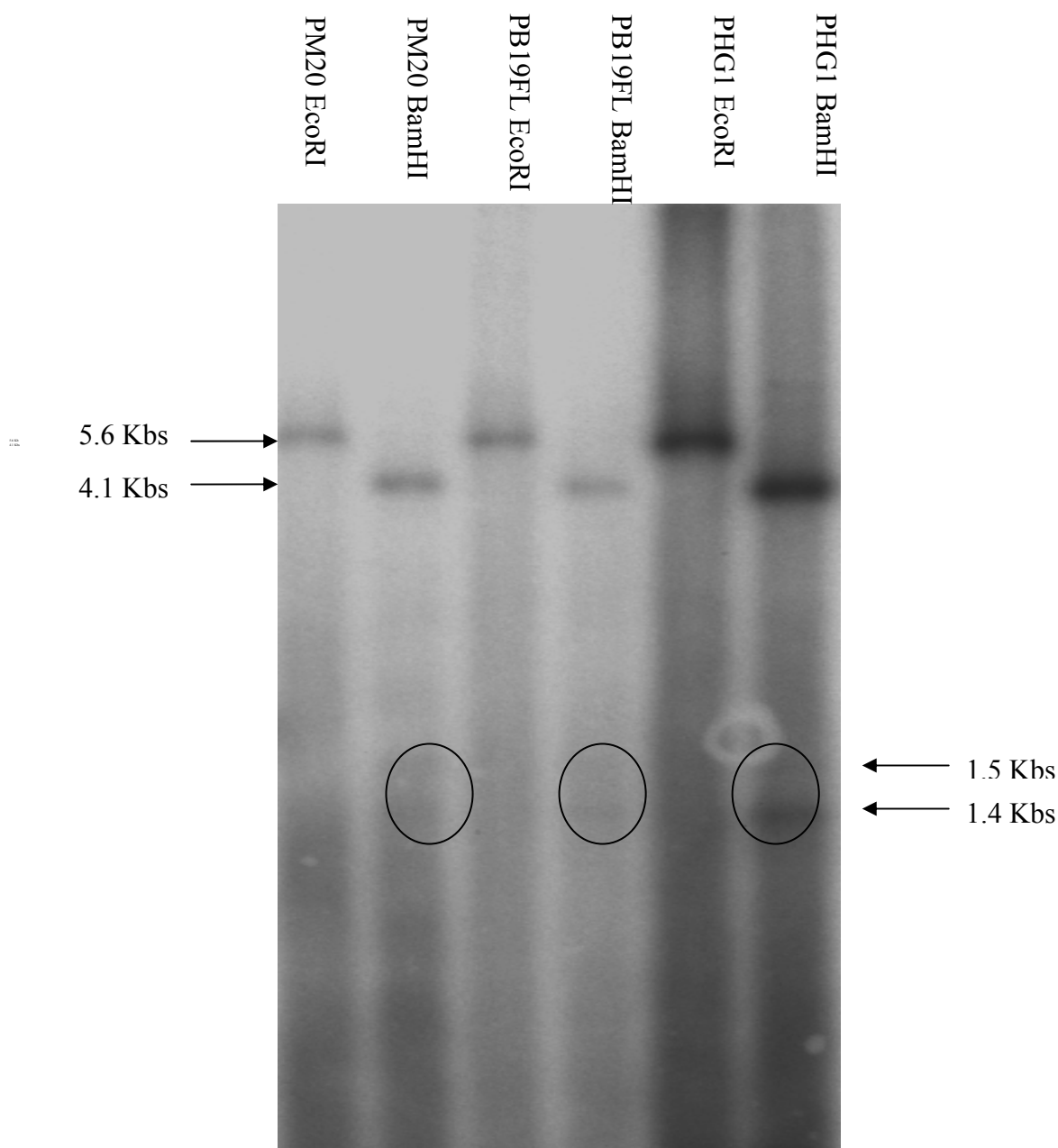
Il numero di cellule positive in IF dopo trasfezione con il plasmide pB19-M20 è 10 volte quello osservato nelle UT7/Epo-S1.

Risultati II- Analisi cloni genomici e subgenomici

Analisi dell'attività infettante dei cloni genomici del B19

Analisi del DNA

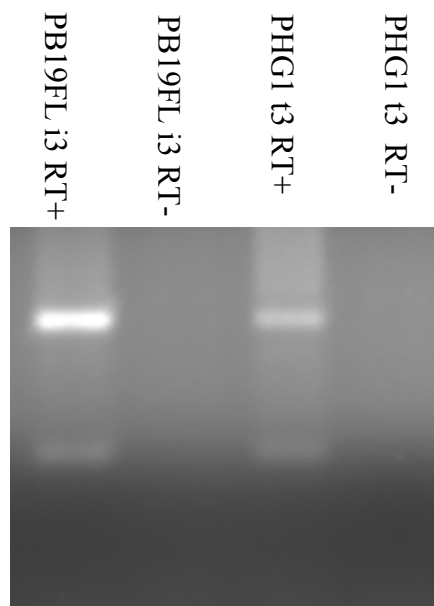
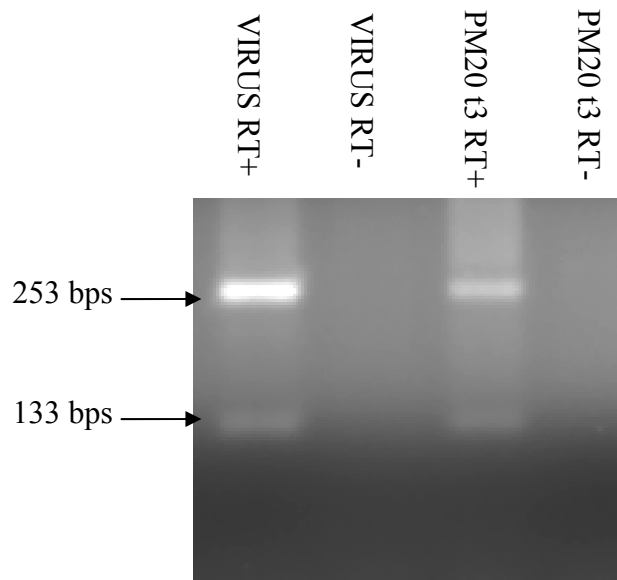
Le cellule trasfettate con i tre cloni genomici del B19 sono state analizzate mediante Southern Blot dopo digestione con BamHI per la ricerca della produzione da parte dei cloni delle caratteristiche forme replicative (Ozawa 1986). I tipici frammenti di 1.5 e 1.4 Kbs sono stati osservati per tutti e tre i cloni genomici oggetto di studio.



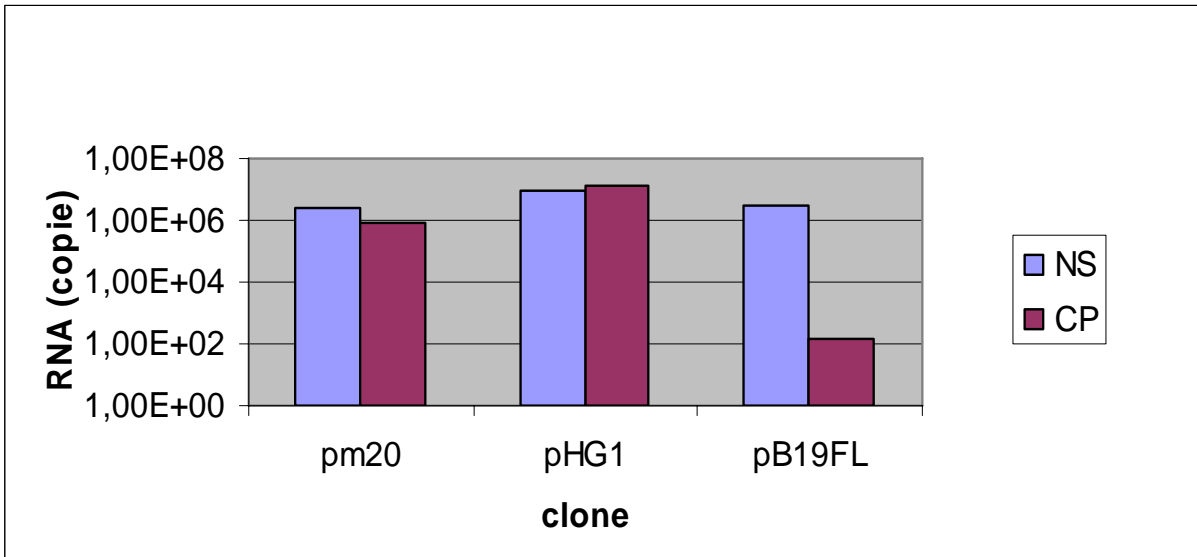
Analisi RNA

RNA post-trasfezione

L'analisi dei trascritti post-trasfezione ha mostrato la presenza delle due bande caratteristiche di frammenti di 253 e di 133 bps, corrispondenti ai trascritti maturi (dopo splicing) per le proteine capsidiche, per tutti e i tre cloni genomici oggetto dello studio.

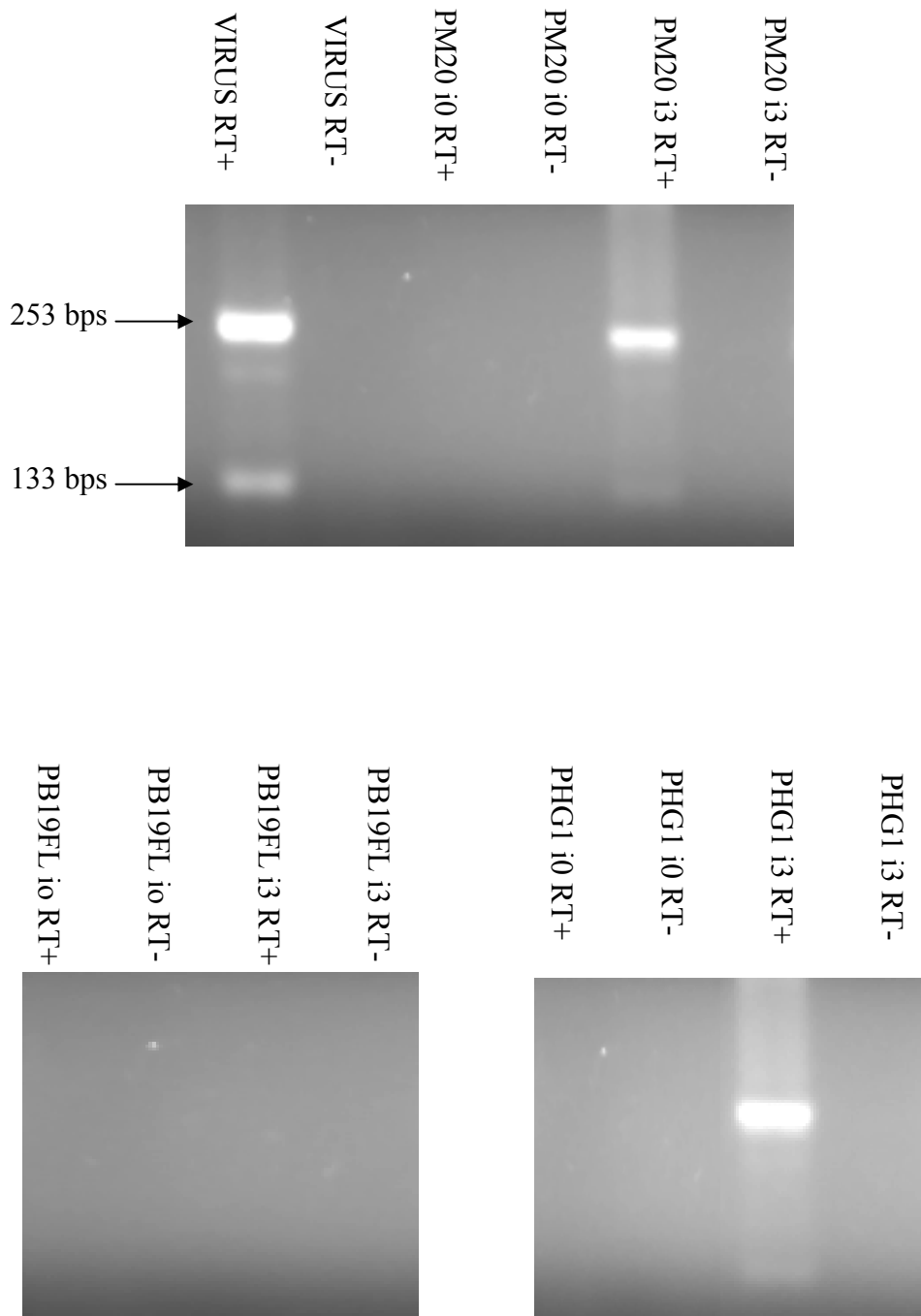


Inoltre l'analisi post-trasfezione in real time RT-PCR per i trascritti NS e CP indica un diverso rapporto tra NS e CP per i diversi cloni genomici. Il livello di trascritti per l'NS è confrontabile tra i tre cloni, ma per il valore relativo al trascritto delle proteine capsidiche è 4 log inferiore per il clone pB19FL.



RNA post-infezione

Il saggio PCR dei campioni di cDNA relativi ai cloni genomici ha mostrato la presenza dei trascritti maturi attesi nelle UT7/EpoS1 e nelle CD36⁺ infettate con il lisato cellulare proveniente dalle cellule trasfettate con pHG1 e con pB19-M20, come osservato nell'infezione di controllo con il virus wild type. Non è stata riscontrata la presenza dei trascritti per il clone pB19FL.

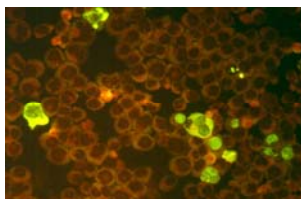


Espressione delle proteine

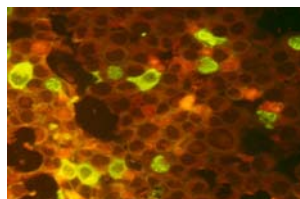
L'analisi in immunofluorescenza per gli epitopi conformazionali ha mostrato una simile efficienza di trasfezione per i tre cloni genomici.

Il saggio di Western Blot per l'analisi degli epitopi lineari (figura 10b) ha indicato che la produzione di proteine capsidiche da parte del clone pB19FL è più bassa rispetto ai cloni pB19-M20 e pHG1.

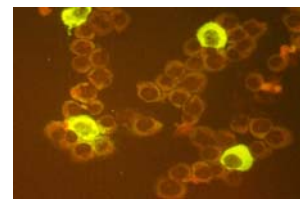
- Epitopi conformazionali: IF



PM20

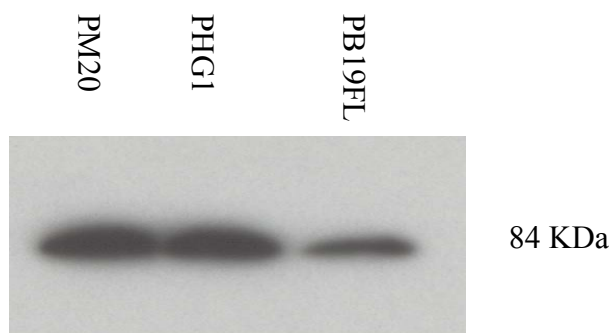


pHG1



pB19FL

- Epitopi lineari: WB



Il saggio di immunofluorescenza post-infezione delle cellule CD36⁺ infettate con il lisato cellulare proveniente dalle stesse CD36⁺ trasfettate parallelamente con i diversi cloni genomici, ha mostrato la presenza di cellule positive per i cloni pB19-M20 e pHG1, seppur con una bassa percentuale (1%), ma non per pB19FL.

Analisi strutturale

Sequenziamento DNA

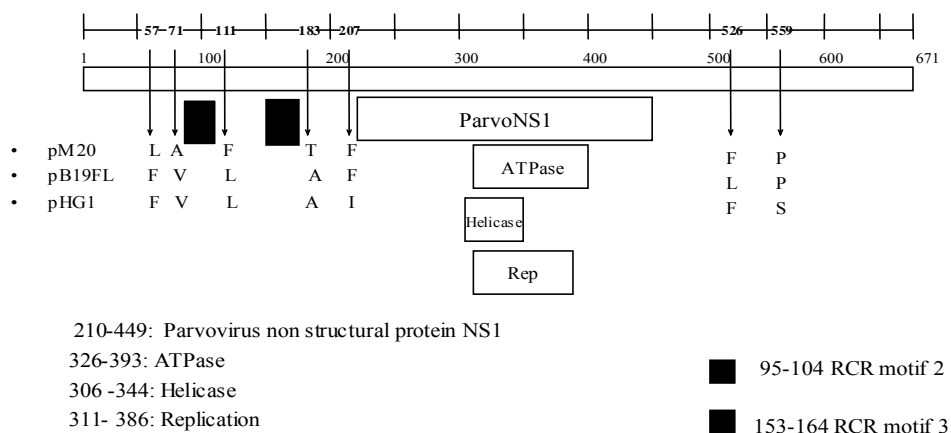
L'analisi della sequenza del DNA dei frammenti ottenuti dalla digestione con BssHII ha mostrato che le sequenze delle hairpin sono le stesse per i tre cloni genomici del B19, ad eccezione di una delezione (mancanza di una T al nt 171) in pHG1 (presente nella sequenza di HV in GeneBank), e di una delezione (T assente qualche base fuori dalla regione delle hairpin) in pB19FL .

Allineamento proteine

L'allineamento delle sequenze aminoacidiche primarie delle proteine espresse dai cloni genomici del B19 ha portato all'individuazione di alcune differenze tra i cloni pB19FL, pHG1 e pB19-M20. Le mutazioni riguardano le proteine NS, 11KDa, VP1, VP2.

- Proteina NS

L'allineamento riguardante la proteina NS ha mostrato alcune sostituzioni, ma nessuna di esse è localizzata in regioni funzionalmente importanti per l'attività della proteina.



Studio della regione VP1 unica

Clonazione VP1u

I cloni per la regione VP1 unica pB19-M20pET, pHG1pET sono stati ottenuti mediante il metodo descritto e sottoposti ad analisi di sequenza. I cloni corretti sono stati utilizzati dopo conferma della sequenza parallelamente per il saggio mutagenesi e per l'espressione della proteina.

Non è stato possibile ottenere il clone corretto dal plasmide pB19FL.

Mutagenesi sito-specifica

I mutanti ottenuti e controllati mediante sequenziamento sono stati chiamati rispettivamente pB19M20-FL and pB19M20pET-FL, visto che essi presentano la mutazione puntiforme trovata nel clone pB19FL inserita rispettivamente nel clone genomico wild type pB19-M20 e nel clone della VP1u pB19-M20pET. Entrambi i mutanti contengono una sostituzione (A al posto di G) rispettivamente al nt 3149 del genoma del B19 nel clone pB19-M20 wild type, e al nt 526 della VP1u (nt 530 nel pM20pET) nel clone pM20pET-FL.

Attività infettante del clone mutante

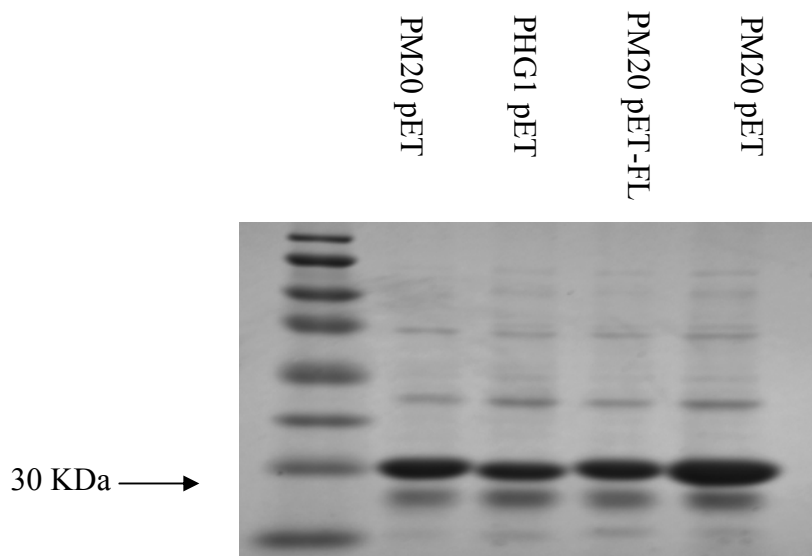
Il mutante pB19-M20-FL non ha mostrato la produzione di virus come suggerisce l'assenza di espressione delle proteine nel saggio di immunofluorescenza effettuato dopo infezione delle cellule CD36⁺ in confronto ai cloni genomici wild type pB19-M20 e pHG1.

Espressione VP1 unica

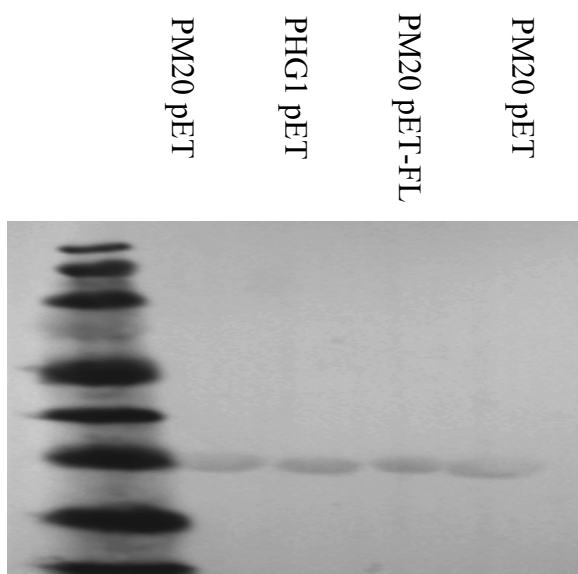
Le proteine ricombinanti sono state espresse dai cloni wild type pB19-M20pET, pHG1pET e dal clone mutante pB19M20pET-FL. La corretta dimensione della proteina è stata confermata mediante SDS-PAGE dei lisati cellulari relativi a ogni clone. La colorazione con Coomassie Blue del gel di poliaccrilamide e l'analisi in Western Blot ha evidenziato la presenza della proteina his tagged a 30 KDa di peso molecolare. La dimensione della VP1u è 25 KDa (227 residui).

I risultati relativi alla quantificazione della proteina sono stati per tutti i cloni intorno a 50 ng/μl.

- Colorazione con Coomassie Blue dei lisati cellulari:



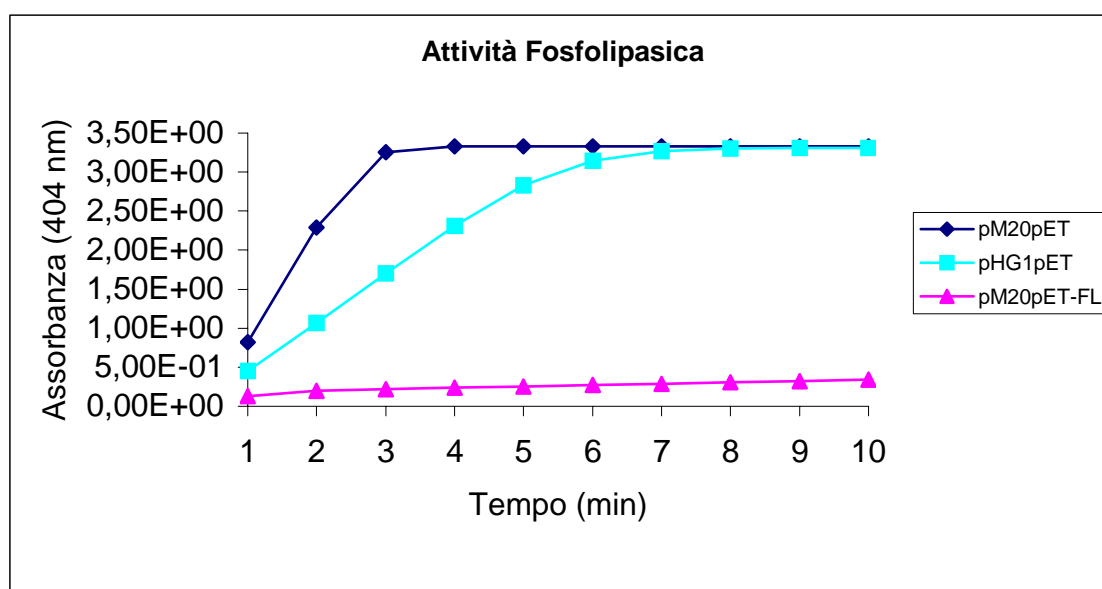
- Western blot delle proteine ricombinanti purificate:



Analisi dell'attività fosfolipasica

L'analisi colorimetrica dell'attività catalitica della PLA₂ delle diverse VP1u ricombinanti ha mostrato che la proteina espressa dal clone mutante pB19M20pET-FL non presenta alcuna attività enzimatica in confronto alle proteine ricombinanti espresse dai cloni wild type pB19M20pET e pHG1pET.

Proteina VP1u	Attività PLA ₂ ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$)
pB19-M20pET	0.588
pHG1pET	0.670
pB19-M20pETFL	0.048



Analisi di mutagenesi

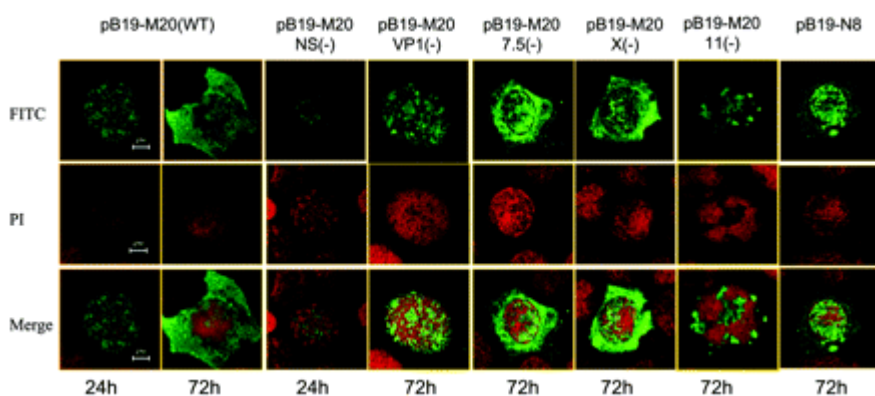
I mutanti costruiti mediante l'analisi di mutagenesi sito-specifica sono stati analizzati per la presenza di DNA, RNA e proteine secondo i metodi descritti per i cloni genomici.

La tabella seguente indica il sommario dei cambiamenti fenotipici dei mutanti del B19. Tutti i risultati sono relativi all'infezione col clone infettante wild type pB19-M20.

Mutazione e nome del plasmide	Produzione di virus infettante	Replicazione del DNA del B19	Produzione delle proteine capsidiche e distribuzione
ITR pB19-M20/N8	No	No	Nessuna differenza
NS pB19-M20/NS(-)	No	No	Marcata diminuzione a livello nucleare
VP1 pB19-M20/VP1(-)	No	No cambio significativo	Solo nucleari
VP2 pB19-M20/VP2(-)	Non determinato	No cambio significativo	Non determinato
11 kDa pB19-M20/11(-)	Diminuzione significativa	Noi cambio significativo	Diminuzione a livello nucleare
7.5 kDa pB19-M20/7.5(-)	No cambio significativo	No cambio significativo	Nessuan differenza
ORF X pB19-M20/x(-)	No cambio significativo	No cambio significativo	Nessuna differenza

Microscopia confocale

L'analisi in microscopia confocale ha permesso di monitorare l'accumulo e la localizzazione delle proteine capsidiche.



Analisi quantitativa cloni genomici e subgenomici

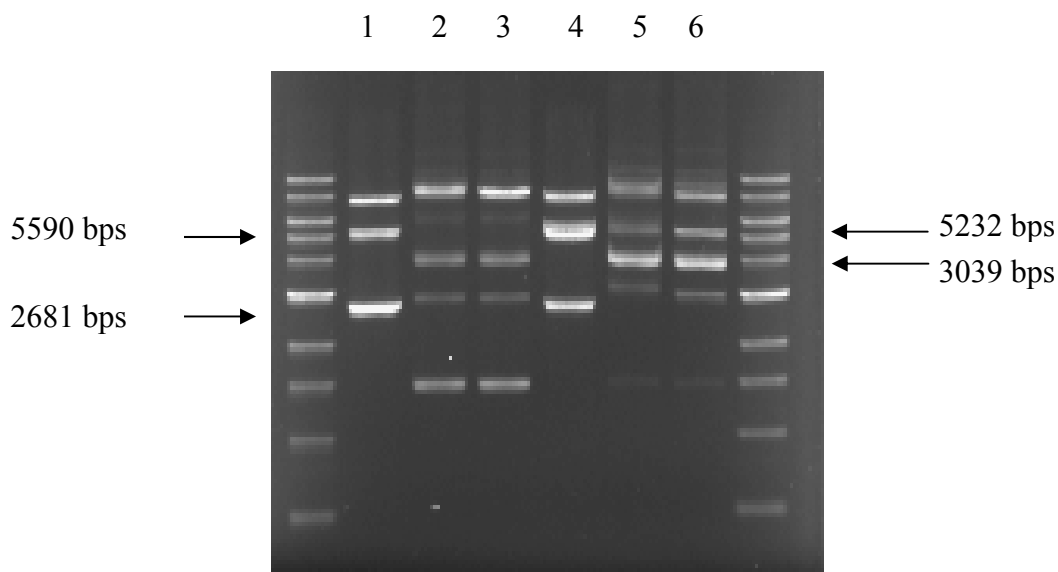
Analisi elettroforetica

I plasmidi ricombinanti sono stati controllati mediante reazione di restrizione col rispettivo enzima nel sito di clonazione. Per la valutazione quantitativa è stato utilizzato anche il plasmide pHG0, corrispettivo di pHG1 in una diversa configurazione delle sequenze palindromiche terminali.

I due cloni sono stati digeriti con l'enzima BsaBI, BssHII e Eco47III, per verificare la corretta lunghezza e la stabilità delle hairpin. I risultati mostrano che entrambi i cloni danno luogo, dopo digestione alle corrette bande, anche se si osservano bande aggiuntive e materiale non tagliato.

La visualizzazione delle bande dei diversi gel di elettroforesi evidenzia che per pHH0, pHH1, pHI0 e pHJ0, i cloni forniscono i frammenti attesi, pertanto le colture cellulari corrispondenti contengono i plasmidi ricombinanti di interesse.

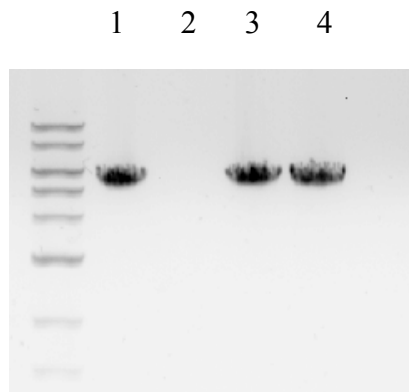
Clone pHG1-pHG0



1	2	3	4	5	6
pHG1 BsaBI	pHG1 BssHII	pHG1 Eco47III	pHG0 BsaBI	pHG0 BssHII	pHG0 Eco47III

Analisi cclDNA

La digestione con enzima Esonucleasi Lambda ha confermato l'avvenuta reazione di ligasi in vitro tra l'inserto HI0 e le sequenze sintetiche TR0-TR1. Il prodotto di reazione è un intermedio chiuso resistente alla digestione con l'enzima, che invece taglia i prodotti aperti.



1	2	3	4
HI0 Eso-	HI0 Eso+	ccl Eso-	ccl Eso+

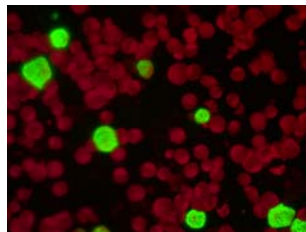
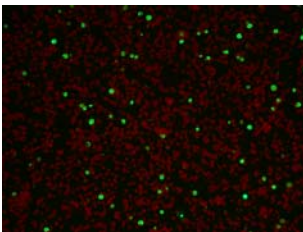
Analisi delle proteine

Immunofluorescenza

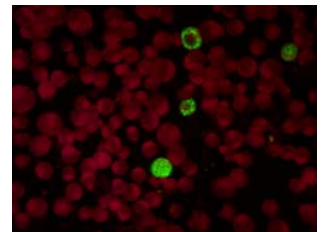
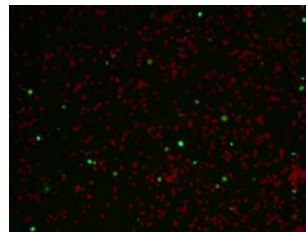
Il saggio di immunofluorescenza è stato effettuato a 48 h post-trasfezione.

L'osservazione al microscopio a fluorescenza dei campioni ha evidenziato l'espressione di VP1 e VP2. Il saggio mostra una differenza significativa fra i cloni nella quota di cellule positive, nonostante l'equivalente quantità di DNA utilizzata per la trasfezione, alle stesse condizioni sperimentali. Rispetto al controllo pHG1, in cui si osserva una percentuale di cellule positive pari al 30 %, nei cloni pHHI, pHH0 e pHI0 il saggio post trasfezione mostra una positività tra il 5 e il 10%. Il cclDNA mostra una percentuale intermedia di cellule positive (7 %) e pHJ0 non evidenzia la presenza di cellule positive alle proteine capsidiche del B19.

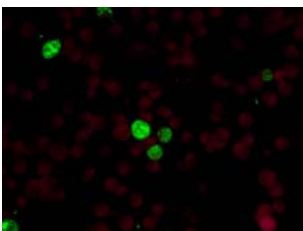
pHG1



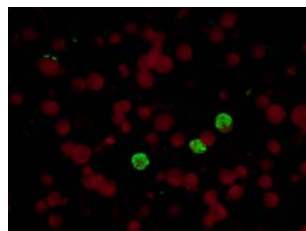
cclDNA



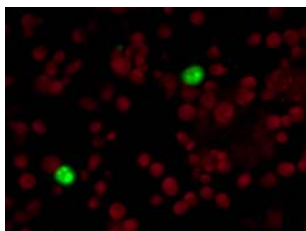
pHH0



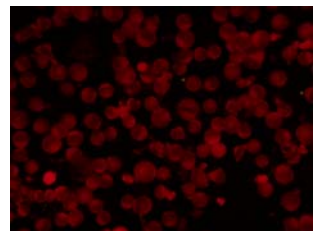
pHH1



pHI0

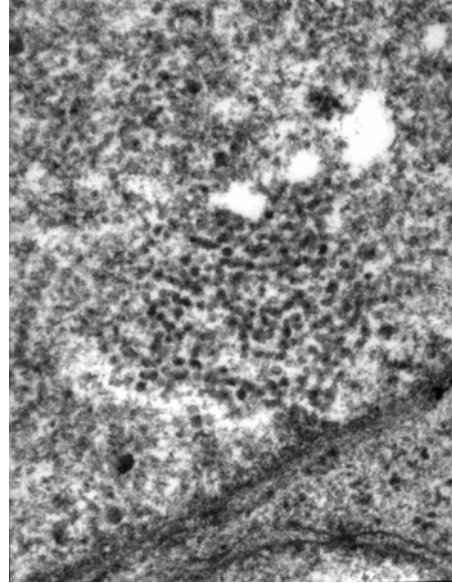
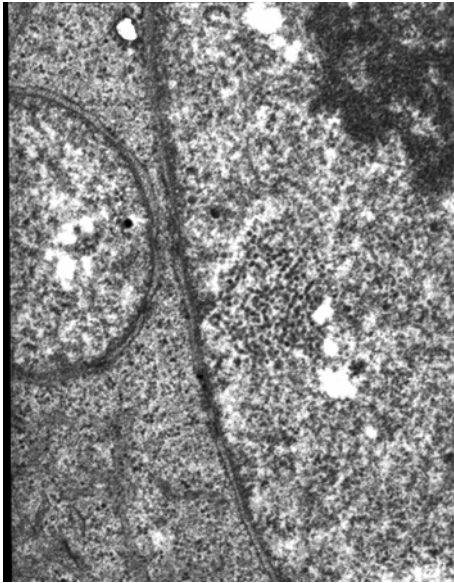


pHJ0



Analisi al microscopio elettronico a trasmissione

L'analisi al microscopio elettronico a trasmissione sui campioni di cellule trasfettate con il clone genomico pHG1 ha mostrato la presenza di capsidi virali.



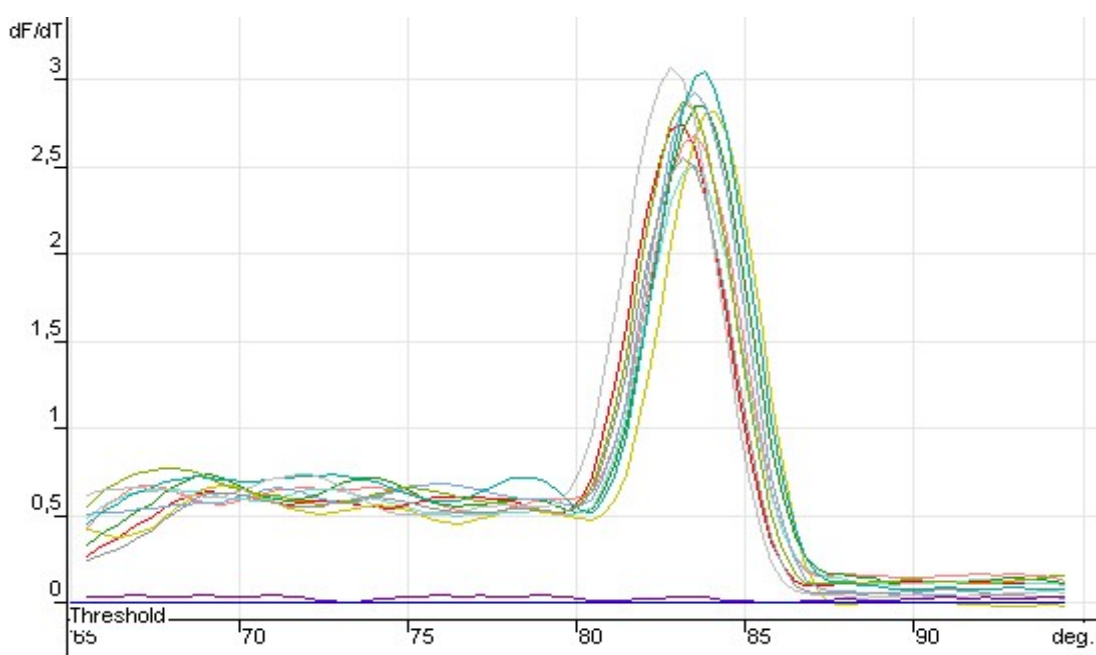
Real-time PCR

Dai segnali di fluorescenza relativi alle diverse reazioni di amplificazione sono stati determinati dal programma i valori Ct per i diversi campioni, posizionata la threshold ad un livello pari a 0.15.

Sono stati inoltre forniti dal software i valori di efficienza di amplificazione (E) relativi alle singole reazioni e specifici per la coppia di primer usata.

Analisi del melting

La specificità dei primer e l'eventuale formazione di primer dimeri sono state determinate mediante analisi della curva di melting, che ha evidenziato un unico picco relativo al target di interesse:

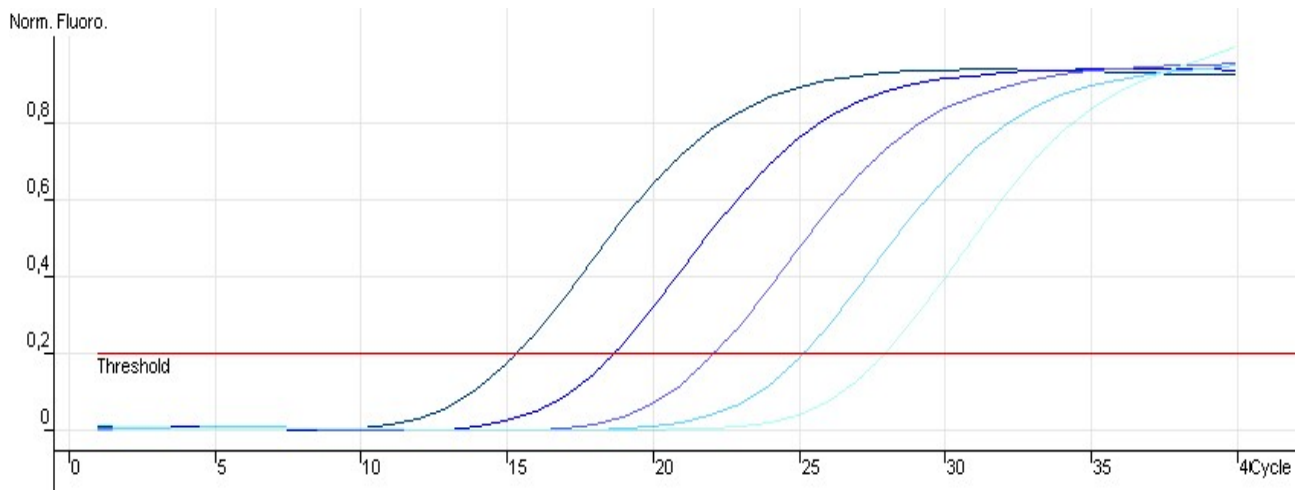


Curva di melting per l'amplificazione del DNA virale

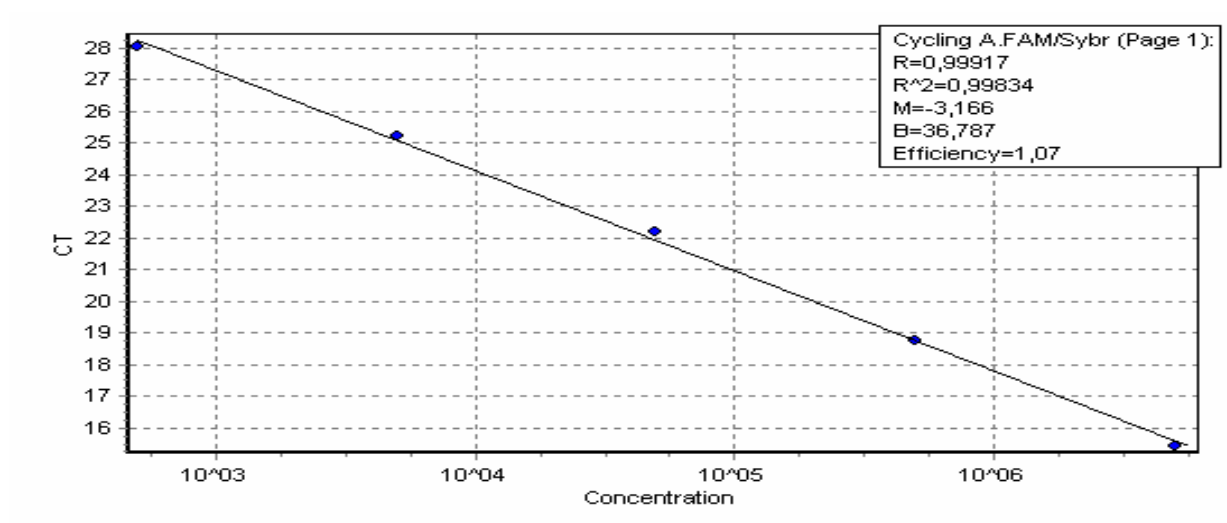
Bersaglio HR0-Costruzione di retta standard

L'amplificazione di diluizioni scalari di standard HR0 ha mostrato i seguenti risultati:

	Ct	Concentrazione sperimentale (copie/reazione)	Concentrazione teorica (copie/reazione)
HR0 5*10 ⁶	15,41	5,00E+06	5,64E+06
HR0 5*10 ⁵	18,75	5,00E+05	4,99E+05
HR0 5*10 ⁴	22,17	5,00E+04	4,13E+04
HR0 5*10 ³	25,2	5,00E+03	4,55E+03
HR0 5*10 ²	28,01	5,00E+02	5,91E+02



La retta di riferimento è stata costruita da partire dai valori sperimentali:



Quantificazione assoluta DNA

L'interpolazione della retta da utilizzare ha consentito l'ottenimento della quantificazione dei campioni incogniti di DNA post-trasfezione e post-infezione con il lisato cellulare.

Quantificazione relativa RNA

Gli RNA sono stati amplificati con la coppia a ponte selettiva per l'RNA maturo corrispondente alla VP1. Sono stati valutati i valori di crossing point (Ct), corrispondenti alla quantità di RNA bersaglio. Tali valori sono stati utilizzati per valutare il rapporto sul Ct del corrispondente DNA, al fine di ottenere una valutazione relativa della quantità di trascritto rispetto alla quantità di DNA stampo.

Analisi DNA lisato

Il lisato ottenuto dalle cellule trasfettate col clone pHG1 è stato diversamente trattato (come precedentemente descritto) al fine di consentire una minimizzazione del segnale di background per la valutazione quantitativa degli acidi nucleici dopo infezione.

	Enzima	Tempo	Enzima	Tempo
1	no			
2	RNasi (Ambion)	overnight		
3	DNasi (Roche)	overnight		
4	DNasi (Roche) + RNasi (Ambion)	overnight		
5	RNasi (Ambion)	overnight	DNasi (Roche)	overnight
6	DNasi (Roche)	overnight		
7	DNasi (Roche)	overnight	RNasi (Ambion)	3 h
8	DNasi (Roche)	overnight	RNasi (Ambion)	overnight
9	RNasi (Ambion)	overnight	DNasi	3 h
10	no			
11	DNasi (Roche)	4 h		
12	RNasi (Roche)	4 h		
13	DNasi (Roche)	4 h	RNasi (Roche)	4 h
14	DNasi (Roche) + RNasi (Roche)	4 h		

I risultati relativi al DNA sono stati ottenuti per interpolazione sulla retta standard.

DNA lisati	Ct	Conc.
Lisato 1	19,3	3,33E+05
Lisato 2	20,59	1,30E+05
Lisato 3	25,58	3,47E+03
Lisato 4		
Lisato 5		
Lisato 6	26,8	1,43E+03
Lisato 7	21,1	9,04E+04
Lisato 8	27,34	9,62E+02
Lisato 9	20,3	1,61E+05
Lisato 10	14,28	1,28E+07
Lisato 11	18,28	6,99E+05
Lisato 12	15,69	4,60E+06
Lisato 13	14,64	9,86E+06
Lisato 14	16,79	2,06E+06

Analisi RNA lisato

L'RNA dopo digestione del lisato ha mostrato i seguenti risultati:

RNA lisati	Ct DNA	Ct RNA	ratio
Lisato 1	19,3	16,38	1,178266
Lisato 2	20,59	33,56	0,613528
Lisato 3	25,58	30,12	0,849269
Lisato 4		30,58	
Lisato 5			
Lisato 6	26,8	30,07	0,891253
Lisato 7	21,1	36,81	0,573214
Lisato 8	27,34		
Lisato 9	20,3		
Lisato 10	14,28	15,31	0,932724
Lisato 11	18,28		
Lisato 12	15,69		
Lisato 13	14,64	29,16	0,502058
Lisato 14	16,79	27,97	0,600286

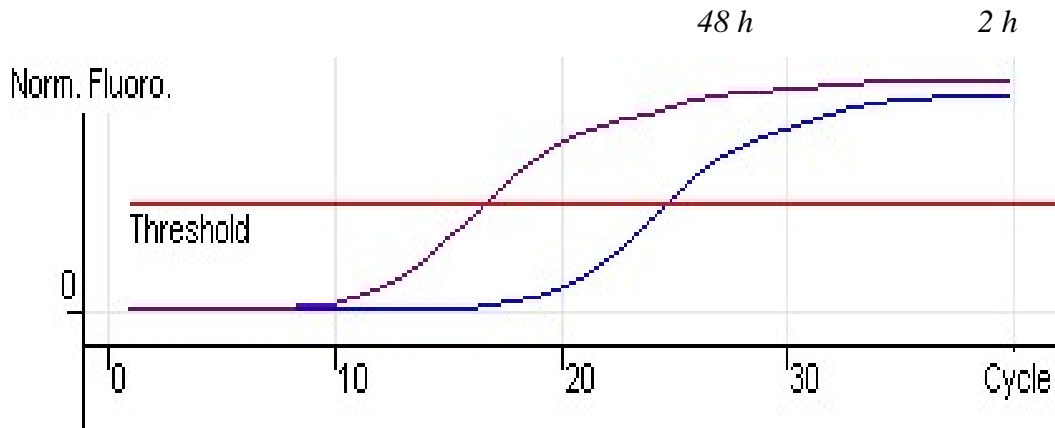
Analisi DNA post-trasfezione

I valori ottenuti relativi alle 2 ore e alle 48 ore post trasfezione sono stati calcolati per interpolazione sulla retta standard e sono illustrati come segue:

DNA Trasfezione		Ct	Conc.
pHG1			
	2 h pt	15,44	5,54E+06
	48 h pt	12,02	6,66E+07
pHG0			
	2 h pt	15,78	4,31E+06
	48 h pt	15,28	6,20E+06
ccIDNA			
	2 h pt	20,12	1,84E+05
	48 h pt	19,48	2,93E+05
pHH1			
	2 h pt	17,36	1,37E+06
	48 h pt	16,15	3,30E+06
pHH0			
	2 h pt	17,36	1,37E+06
	48 h pt	14,93	7,99E+06
pHI0			
	2 h pt	10,66	1,78E+08
	48 h pt	12,33	5,29E+07
pHJ0			
	2 h pt	10,69	1,75E+08
	48 h pt	11,69	8,43E+07

Analisi RNA post-trasfezione

Il controllo positivo di riferimento è stato il clone pHG1, che mostra un'elevata attività trascrizionale dopo trasfezione.



I valori relativi alle 2 ore e alle 48 ore post-trasfezione per l'RNA sono espressi come rapporto dei Ct relativi al DNA stampo e al trascritto RNA per il determinato campione.

RNA trasfezione		Ct DNA	Ct RNA	ratio
pHG1				
	2 h pt	9,36	20,86	0,448706
	48 h pt	8,46	11,3	0,748673
pHG0				
	2 h pt	15,78	30,9	0,51068
	48 h pt	15,28	22,03	0,6936
ccIDNA				
	2 h pt	20,12	18,57	1,083468
	48 h pt	19,48	13,7	1,421898
pHH0				
	2 h pt	17,36	27,87	0,622892
	48 h pt	14,93	17,33	0,861512
pHH1				
	2 h pt	17,36	29,14	0,595745
	48 h pt	16,15	23,73	0,680573
pHI0				
	2 h pt	10,66	29,44	0,362092
	48 h pt	12,33	19,4	0,635567
pHJ0				
	2 h pt	10,69	23,04	0,463976
	48 h pt	11,69	24,13	0,484459

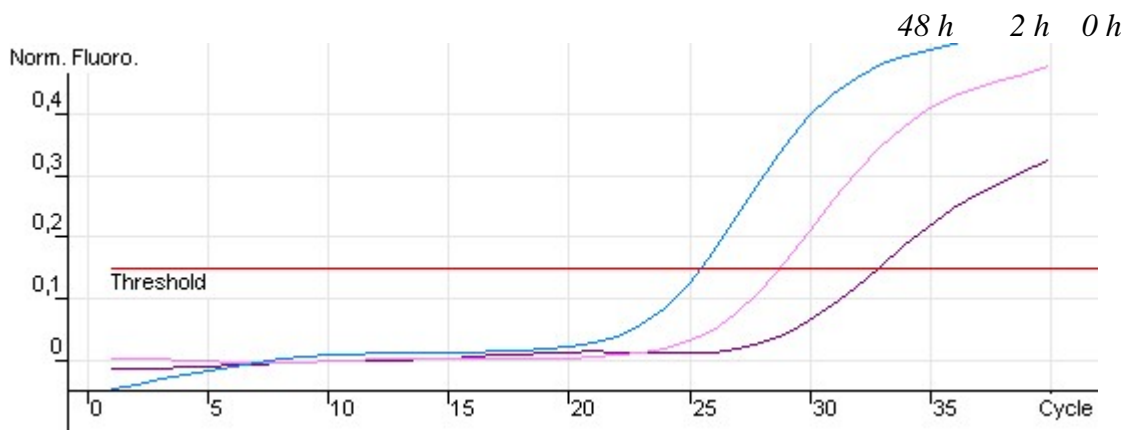
Analisi DNA post-infezione

I valori relativi alle 0 ore, corrispondenti al lisato utilizzato come input, e alle 2 e 48 ore post infezione sono i seguenti:

DNA Infezione		Ct	Conc.
pHG1			
	lisato	24,88	5,77E+03
	2 h pi	24,27	9,00E+03
	48 h pi	26,08	2,40E+03
pHG0			
	lisato	26,87	1,36E+03
	2 h pi	27	8,00E+02
	48 h pi	29,24	2,42E+02
ccIDNA			
	lisato	23,12	2,07E+04
	2 h pi	23,12	2,07E+04
	48 h pi	21,54	6,55E+04
pHH0			
	lisato	28,35	4,63E+02
	2 h pi	27,95	6,22E+02
	48 h pi	30,92	7,14E+01
pHH1			
	lisato	28,35	4,63E+02
	2 h pi	29,15	2,58E+02
	48 h pi	30,92	7,14E+01
pHI0			
	lisato	31,9	3,50E+01
	2 h pi	31,49	4,70E+01
	48 h pi	30,52	9,55E+01
pHJ0			
	lisato	28,15	5,35E+02
	2 h pi	27,56	8,19E+02
	48 h pi	27	8,00E+00

Analisi RNA post-infezione

L'RNA post infezione è stato analizzato per le 0 ore (lisato input), 2 ore e 48 ore, utilizzando come controllo il clone pHG1 in cui è stato osservato il maggiore aumento:



RNA infezione		Ct DNA	Ct RNA	ratio
pHG1				
	lisato	24,88	31,41	0,792104
	2 h pi	24,27	27,71	0,875857
	48 h pi	26,08	24,48	1,065359
pHG0				
	lisato	26,87	32,38	0,829833
	2 h pi	27	30,28	0,891678
	48 h pi	29,24	31,61	0,925024
ccIDNA				
	lisato	23,12	40,12	0,576271
	2 h pi	23,12	40,12	0,576271
	48 h pi	21,54	35,35	0,609335
pHH0				
	lisato	28,35	34,82	0,814187
	2 h pi	27,95	30,52	0,915793
	48 h pi	30,92	33	0,93697
pHH1				
	lisato	28,35	34,82	0,814187
	2 h pi	29,15	34,77	0,838366
	48 h pi	30,92	33	0,93697
pHI0				
	lisato	31,9	34,85	0,915352
	2 h pi	31,49	31,92	0,986529
	48 h pi	30,52	31,29	0,975391
pHJ0				
	lisato	28,15	33,76	0,833827
	2 h pi	27,56	31,62	0,8716
	48 h pi	27	30,48	0,885827

Discussione

Il lavoro di ricerca svolto ha riguardato l'analisi molecolare e funzionale di cloni genomici e subgenomici in cellule permissive all'infezione da Parvovirus B19.

Il patogeno umano Parvovirus B19 mostra un tropismo selettivo per la linea eritroide, infettando in maniera produttiva i progenitori eritroidi e gli eritroblasti del midollo osseo, del sangue periferico, del fegato fetale, del sangue del cordone ombelicale. In vitro, solo un limitato numero di linee cellulari è in grado di sostenere la replicazione virale, e, in studi precedenti, è stato dimostrato che le cellule UT7/Epo-S1, un subclone di una linea cellulare megacarioblastoide, sono il sistema più sensibile all'infezione. Tuttavia anche queste cellule sono da ritenere semi-permissive, dando luogo ad una limitata produzione virale.

Parte di questo lavoro ha riguardato la messa a punto di un saggio di eritropoiesi in vitro al fine di generare una popolazione pura di progenitori eritroidi a partire da espansione e differenziamento di cellule staminali totipotenti CD34⁺ da sangue periferico.

Altri autori hanno ottenuto cellule eritroidi a diversi stadi di differenziamento dalle cellule CD34⁺ [Giarrattana et al., 2005; Sugawara et al., 2001; Sawada et al., 1987; Migliaccio et al., 1992; Migliaccio et al., 2002]. L'ottenimento di una popolazione pura di progenitori eritroidi, come suggerito da studi precedenti, [Joost et al., 1994; Okumura et al., 1992; Maguer-Satta et al., 2004; Nakahata et al., 1994; Freyssinier et al., 1999] fornisce un buon sistema di cellule da usare nei saggi di infezione in vitro col Parvovirus B19 [Sugawara et al. 2001].

Le cellule CD34⁺ hanno richiesto condizioni di crescita senza siero [Landsdorp et al., 1995] e un terreno ricco di fattori di crescita. La presenza di EPO è stata importante per promuovere l'espansione del lineage eritroide [Freyssinier et al., 1999], vista la sensibilità degli eritroblasti nei confronti dell'eritropoietina [Casadevall et al., 1993]. Inoltre l'IL-3 potrebbe aver agito mantenendo o arrestando le cellule ad uno stadio di blastoide ed evitando un completo differenziamento [Ogawa et al., 1993]. Le cellule staminali CD34⁺ si sono dimostrate sensibili all'idrocortisone [Von Lindern et al., 1999], anch'esso presente nel terreno di espansione da noi utilizzato.

E' stata attentamente monitorata la popolazione cellulare durante l'espansione per evitare stadi di differenziamento non desiderati e potenziale morte cellulare o diminuzione nella popolazione. Inizialmente, quando le cellule si trovavano in terreno di mantenimento, sono diminuite del 95% e poi, quando coltivate in terreno di espansione, sono cresciute fino a 3x10⁶/ml. Dopo il giorno 11, le cellule hanno mostrato una diminuzione dell'espansione, o se continuava l'espansione, andava avanti il differenziamento. E' stato infatti osservato che le cellule, mantenute a confluenza superiore a 4x10⁴/ml, andavano incontro al differenziamento terminale in eritrociti, probabilmente per un esaurimento di citochine e fattori di crescita nel terreno di coltura [Giarrattana et al. , 2005].

Le cellule sono state caratterizzate per la presenza dei vari antigeni di superficie e testate per la loro permissività all'infezione da B19.

Tutti i precursori emopoietici possono essere identificati mediante la distribuzione dei marker di superficie [Morey et al., 1992; Watt et al., 1987]. La popolazione generata appartiene al lineage eritroide, come determinato dalla presenza dell'antigene di superficie CD36. CD36 è un antigene di membrana presente in molte cellule del sangue [Joost et al., 1994]. E' stato rilevato come marker nelle cellule progenitrici eritroidi precoci, mentre è presente tardivamente nelle cellule megacariocitiche e monocitiche. L'analisi FACS ha mostrato che il 100% delle cellule è CD34⁻/CD36⁺ dopo 8 giorni in terreno di espansione. Come risultato, la popolazione di cellule generata non ha richiesto ulteriore separazione immunoelettromagnetica o mediante altri mezzi. Inoltre dall'analisi al citofluorimetro è stato osservato che anche le cellule UT7/Epo-S1, il migliore sistema cellulare per il saggio di infezione in vitro disponibile al momento dello studio, sono CD36⁺. E' stato inoltre osservato che le cellule neogenerate presentano il recettore per il Parvovirus B19, l'antigene P, e altri antigeni riconosciuti come necessari per mantenere la condizione di sensibilità all'infezione virale, come il CD71 e la glicoforina A.

L'infettività delle cellule CD36⁺ è stata confrontata con quella già nota della linea cellulare UT7/Epo-S1. L'infezione delle cellule con diluizioni seriali di virus è stata seguita da analisi quantitative mediante real-time PCR e RT-PCR per la valutazione della replicazione virale e la ricerca dei trascritti virali, e analisi mediante IF per la produzione delle proteine capsidiche. La PCR quantitativa per rivelare il DNA virale ha mostrato un aumento di 500 volte nella produzione di DNA virale nelle CD36⁺ rispetto alle UT7/Epo-S1 allo stesso end-point (10^4 - 10^5 ge/ml). Utilizzando la real time RT-PCR per la rivelazione dei trascritti virali, i risultati hanno mostrato che la linea cellulare UT7/Epo-S1 e le cellule CD36⁺ mostrano sensibilità confrontabile per l'infezione col B19, con trascritti rivelati in colture inoculate con 10^4 ge/ml; ma il livello di trascritti nelle CD36⁺ è significativamente più alto. Inoltre l'analisi dell'RNA mostra che l'aumento dei trascritti maturi non è esponenziale come per le UT7/Epo-S1, ma raggiunge il massimo ad una diluizione di 10^{-6} di virus.

Dal saggio di immunofluorescenza, monitorando la produzione delle proteine capsidiche su cellule infettate con diluizioni seriali di virus, è stato osservato che le CD36⁺ mostrano 3 logaritmi di sensibilità in più rispetto alle UT-7/Epo-S1 (10^6 vs 10^9 ge).

I nostri risultati del saggio di infezione suggeriscono che al giorno 8 in terreno di espansione gran parte della popolazione è commissionata verso il lineage eritroide, a conferma del fatto che questo sembra essere il miglior tempo per infettare le cellule col virus B19. Gli eritroblasti a questo stadio esprimono il CD71 come recettore per la transferrina [Migliaccio et al., 2002; Gershor et al., 2001],

la proteina sierica di trasporto del ferro, che controlla mediante questo pathway la proliferazione cellulare, e la glicoforina A [Migliaccio et al., 2001].

Al fine di determinare se le cellule neogenerate potessero essere utilizzate per produrre virus infettante dai cloni genomici a disposizione per l'analisi funzionale, si sono messe a punto condizioni ottimali per la trasfezione delle stesse. Nonostante sia stato osservato che il giorno 8 in terreno di espansione sia il momento migliore per trasfettare le cellule CD36⁺, quando sono state trasfettate al giorno 13 in terreno di espansione, è stato riscontrato un alto numero di cellule GFP positive usando le condizioni per le cellule monocitarie. Ciò indica che il differenziamento va avanti e che la popolazione è diversa. Le cellule si espandono fino al giorno 23, ma non restano CFU-E. Risulta dunque critico il momento in cui tali cellule si analizzano, sia per l'infezione che per la trasfezione col virus.

L'analisi funzionale molecolare del B19 è stata effettuata grazie all'uso di cloni contenenti l'intero genoma o parte di esso. In particolare ci si è soffermati sull'analisi dell'attività infettante dei cloni genomici affiancata da uno studio di mutagenesi al fine di trovare le regioni responsabili dell'infettività virale. Successivamente si è proceduto ad un'analisi quantitativa dei cloni genomici e subgenomici.

A seguito di trasfezione, il sistema di cloni ricombinanti, genomici e subgenomici, è stato analizzato per l'attività replicativa, trascrizionale e di espressione proteica degli stessi, e quindi per la loro capacità di portare alla produzione di particelle virali infettanti.

Per la preparazione del DNA plasmidico utilizzato per la trasfezione, si è utilizzato il ceppo batterico Sure2. Svariati tentativi operati in passato al fine di clonare il genoma intero del B19 e produrre un clone infettante, non hanno avuto successo causa le delezioni delle ITR, e la loro instabilità nelle cellule batteriche utilizzate nella fase iniziale di propagazione del plasmide ricombinante. Questo limite evidenzia l'importanza dell'uso del suddetto ceppo, mutagenizzato in modo tale da garantire un maggiore controllo degli eventi di riarrangiamento e delezione del DNA esogeno; il ceppo Sure2 (stop unwanted rearrangement events) è portatore infatti di mutazioni che inattivano le vie enzimatiche in grado di catalizzare tali riarrangiamenti. Inoltre, i batteri sono stati coltivati a 30°C e 37°C ed è stato visto che le condizioni di temperatura possono essere critiche per una buona efficienza di trasformazione e soprattutto per un buon mantenimento della stabilità delle sequenze delle hairpin. Una temperatura inferiore sembra diminuire la percentuale di eventi di ricombinazione.

Per l'esperimento di nucleofezione, sono stati utilizzati i soli inserti genomici: prove precedenti hanno infatti dimostrato che l'escissione dell'inserto dal backbone plasmidico rende maggiore l'efficienza della tecnica stessa.

La trasfezione è stata effettuata utilizzando il sistema di nucleofezione. La nucleofezione è un tipo particolare di elettroporazione, che permette l'inserimento di materiale genetico in cellule difficili da trasfettare mediante metodi classici di trasfezione. Sebbene sia stato tentato l'approccio basato sia sull'elettroporazione, sia sull'uso di liposomi, i migliori risultati si sono ottenuti mediante nucleofezione: è stata osservata una maggiore efficienza di trasfezione, dal momento che il materiale genetico viene ad essere direttamente iniettato nel nucleo, consentendo inoltre una maggiore vitalità delle cellule trasfettate.

L'analisi comparativa funzionale di tre cloni genomici contenenti il genoma full-length del Parvovirus B19 e diversamente progettati e costruiti, ha mostrato come risultato una diversa capacità da parte di essi di produrre virus infettante. In particolare è stato osservato che i cloni pB19-M20 e pHG1 mostrano lo stesso pattern, mentre pB19FL non mostra alcuna evidenza della produzione di virus infettante, quando analizzato per la presenza dei trascritti virali maturi.

L'efficienza di trasfezione è risultata maggiore nelle cellule CD36⁺ rispetto alle UT7/Epo-S1. Quando sono stati utilizzati lisati cellulari da CD36⁺ trasfettate con pB19M20 per infettare cellule CD36⁺ fresche (giorno 8 in terreno di espansione), si è ottenuta una positività in IF fino a 1.5 logaritmi rispetto alle UT7/Epo-S1 (CD36⁺ o UT7/EpoS1 infettate con lisato cellulare da UT-7/Epo-s1 trasfettate). Nonostante la diversa capacità infettante, i tre cloni hanno mostrato una simile efficienza di trasfezione in termini di espressione delle proteine (epitopi conformazionali) e trascritti di RNA maturi. Tuttavia è risultato che il livello dei trascritti di RNA in real-time PCR è confrontabile solo per la regione relativa all'NS, ma non per quella relativa alle proteine capsidiche. Questi dati sono coerenti con il basso segnale osservato in Western Blot durante l'analisi degli epitopi lineari con l'anticorpo monoclonale anti-VP. Inoltre, è stato anche osservato il pattern relativo alla replicazione del DNA post-trasfezione. La replicazione del genoma virale avviene tramite un intermedio replicativo a doppio filamento [Ozawa et al., 1986], seguita da risoluzione dei termini, estensione, e separazione di due prodotti a singolo filamento. La digestione con BamHI ci ha permesso di osservare che i tre cloni possono generare in ugual modo le caratteristiche forme replicative a 1.5 e 1.4 Kbs post-trasfezione.

L'analisi strutturale ha consentito di comprendere le cause della diversa funzionalità dei cloni, permettendo di individuare le regioni responsabili del diverso comportamento biologico.

Riguardo al sequenziamento del DNA, la strategia seguita, mediante l'utilizzo dei prodotti della digestione con BssHII come stampi per la reazione di PCR, ci ha condotto a trarre informazioni sulla struttura secondaria delle hairpin [Ozawa et al., 1986; Deiss et al., 1990], regioni critiche per la replicazione virale. Tuttavia, anche se l'analisi delle sequenze del DNA indica una diversa configurazione dei nucleotidi nella palindrome e la presenza di delezioni per pHG1 e pB19FL,

rispettivamente nella regione delle hairpin o appena alla fine di esse, queste differenze non dovrebbero essere responsabili di una diversa attività biologica in termini di replicazione, espressione delle proteine virali, e infettività, visto che si tratta di sequenze presenti in GeneBank tra le sequenze del Parvovirus B19 (AF162273).

Nel corso dell'analisi strutturale, sono stati effettuati per ogni proteina codificata dai diversi cloni genomici, gli allineamenti della struttura aminoacidica primaria. E' stata riscontrata una mutazione per pB19FL nella regione della proteina VP1. La proteina VP1 è la proteina capsidica minore e presenta 227 aminoacidi all'estremità aminoterminale in aggiunta alla sequenza della VP2 [Agbandje et al., 1994]. La regione VP1 unica è implicata nella risposta immunitaria, visto che anticorpi neutralizzanti vengono prodotti contro di essa [Kawase et al., 1995; Rosenfeld et al., 1992, Soderlund et al., 1992; Saikawa et al., 1993; Miyamura et al., 1994; Zuffi et al., 2001]. Tra i Parvovirus, la proteina VP1 gioca un ruolo nel trafficking intracellulare e nell'infettività virale [Farr et al., 2004; Girod et al., 2002; Tullis et al., 1993]. Recentemente è stata osservata un'attività funzionale della regione della VP1 unica del Parvovirus come enzima [Canaan et al., 2004]. L'attività catalitica osservata è quella della fosfolipasi PLA₂, che include diversi enzimi [Arni et al., 1996]. Tale attività fosfolipasica della regione N-terminale della VP1 unica, caratterizzata per la presenza di Calcio binding loop e di un sito catalitico enzimatico, è stata mostrata come critica per l'infezione virale col B19 [Dorsh et al., 2002; Zadori et al., 2001].

La mutazione osservata nel clone pB19FL è responsabile di un cambiamento significativo nella sequenza aminoacidica: da un acido glutamico a una lisina, che indica una completa differenza nella carica del residuo. Il fatto che questa mutazione riguardi il residuo aminoacidico prossimo a quello conservato, già conosciuto, necessario per l'attività catalitica dell'enzima [Zadori et al., 2001], ci ha condotto a pensare che anche questa posizione potesse essere critica e importante. Inoltre, analizzando tutte le sequenze presenti in GeneBank, è stato visto che l'acido glutamico è sempre conservato, eccetto per il clone costruito a partire dall'isolato NAN (GeneBank AY504945). Per questa ragione, si è deciso di procedere alla clonazione della regione VP1 unica e alla contemporanea analisi mutazionale.

Sono stati ottenuti due mutanti contenenti la stessa sostituzione osservata nel clone pB19FL: pM20-FL corrisponde al clone genomico; pM20pET-FL è un clone subgenomico che esprime la forma mutata della proteina ricombinante VP1. Il saggio di infezione effettuato con il mutante full-length pM20-FL ha mostrato lo stesso pattern del clone pB19FL wild type, senza portare alla produzione di virus infettante. La prova di immunofluorescenza post-infezione nelle cellule CD36⁺ è positiva per pB19-M20 e PHG1, ma non per pB19-FL o pM20-FL, indicando che la mutazione inserita in posizione 176 della VP1 unica, prossima ai residui conservati della regione catalitica fosfolipasica,

può essere critica per l'infettività del clone. Le proteine ricombinanti VP1u wild type e mutante sono state espresse e usate per testare l'attività fosfolipasica. Il risultato del test della fosfolipasi con il mutante ricombinante pM20pET-FL suggerisce che l'assenza dell'attività enzimatica potrebbe essere collegata con la mutazione in posizione 176. I due risultati relativi al saggio di infezione e alla valutazione dell'attività catalitica indicano che la regione N-terminale della VP1 unica, contenente il motivo della Fosfolipasi A₂, è importante per l'infettività del B19. Inoltre la sequenza dell'isolato originario del B19 mostra che la mutazione puntiforme è presente anche nel campione NAN, utilizzato per clonare il pB19FL. Visto che tale variazione non è comune in GeneBank essa potrebbe essere correlata con l'esistenza di isolati virali a diminuita infettività.

L'analisi comparativa strutturale dei cloni ha permesso di valutare che anche il backbone del plasmide, in cui è inserito il genoma del B19, potrebbe essere responsabile di una diversa stabilità. Guardando alle caratteristiche dei plasmidi, la presenza dell'origine M13 [Villette 1996] nel plasmide pLITMUS 29 potrebbe essere correlata con una diminuzione della stabilità del clone pB19-FL.

La disponibilità di cloni infettanti ha consentito uno studio sistematico della funzione delle diverse proteine virali del B19. La costruzione di diversi mutanti del genoma del B19 ha permesso di investigare sui ruoli delle proteine virali nel ciclo del B19 e una migliore comprensione sulla funzione. Sono stati costruiti due gruppi di mutanti. Nel primo gruppo di mutanti, uno stop codon è stato inserito al posto di un codone di inizio della trascrizione del gene virale o nell'open reading frame mediante frameshift. Il secondo gruppo ha compreso mutanti di delezione in cui metà dell'hairpin è stata deleta al 5' e al 3'. È stato esaminato l'impatto di queste mutazioni sull'infettività virale, la replicazione del DNA e la produzione di proteine capsidiche e la loro distribuzione. Le osservazioni principali hanno riguardato i mutanti per le proteine NS e VP1 e i deleti delle ITR che aboliscono completamente l'infettività virale, e il mutante per l'11 KDa che diminuisce la produzione di VP2 e altera il trafficking intracellulare.

A conferma del ruolo fondamentale svolto dalla proteina NS nella replicazione virale e nella citotossicità [Heegard et al., 2002], è stato visto che non viene prodotto virus infettante in cellule trasfettate con mutante con knock out all'NS o con delezione alle ITR, e non c'è replicazione in SB. Anche se non influenza la replicazione virale, il knock out della proteina VP1 abolisce l'infettività virale rispetto al wild type, e blocca il trafficking delle particelle virali del B19 come risulta dall'analisi in microscopia confocale.

Il B19 ha 2 orf minori che sovrappanno le estremità 3' delle ORF dell'NS e della VP che portano alla produzione di proteine 7,5 KDa e 11 KDa. Il mutante relativo alla 11 KDa mostra ridotta infettività, e viene alterato il pattern di distribuzione delle proteine virali capsidiche che formano

cluster nucleari e non vengono esportati al citoplasma, come suggerisce l'analisi mediante microscopia confocale. Inoltre la mutazione introdotta per bloccare l'espressione della 11 KDa genera anche una mutazione puntiforme nelle proteine capsidiche, che potrebbe anche essere direttamente responsabile del fenotipo osservato.

Tali risultati indicano che un corretto sistema di packaging per la produzione di un sistema ricombinante di particelle virali dovrebbe includere le sequenze ITR, NS, VP1, VP2 e 11 KDa.

Inoltre tale analisi accurata di mutagenesi ha dimostrato che una mutazione nel Ca⁺⁺ binding site del motivo della PLA₂ causa la scomparsa dell'infettività, mentre una mutazione nel sito catalitico dell'enzima, porta ad una riduzione della stessa. Questa osservazione conferma il risultato sperimentale ottenuto sul clone pB19FL, che non sarebbe infettante a causa della mutazione puntiforme nella suddetta regione.

Nel corso dell'analisi quantitativa sono stati studiati parallelamente i cloni genomici pHG1 e pHG0 e diversi cloni subgenomici. I cloni in questione contengono il genoma del virus e differenziano fra di loro per l'estensione delle sequenze terminali (TR) agli estremi dell'inserito virale. Il clone pHG1 (configurazione hairpin flip) e il corrispettivo pHG0 (flop) contiene sequenze terminali integre di 380 nt; i cloni subgenomici pHH1 (flip), pHH0 (flop) pH10, pHJ0 sono, invece, il risultato della clonazione del genoma virale contenente porzioni progressivamente minori delle TR. Gli inserti HH1 e HH0 includono una parte delle hairpin fino all'asse di simmetria delle stesse (200 nucleotidi); HI0 ne contiene 141; HJ0 infine è caratterizzato da una quasi totale deplezione di tali sequenze. E' inoltre stato preso in analisi il costrutto cclDNA, ottenuto scindendo dal clone genomico l'inserito virale e ricostruendo le sequenze terminali a forcina del virus tramite ligasi in vitro con oligonucleotidi sintetici.

L'analisi di immunofluorescenza dei campioni ha mostrato una significativa differenza fra i cloni dopo trasfezione di cellule permissive, nonostante l'equivalente quantità di DNA input. Il campione relativo al clone pHG1, il cui inserito corrisponde al genoma virale full-length, mostra una significativa quota di cellule positive, pari al 30% delle cellule trasfettate. I cloni subgenomici pHH1, pHH0 e pH10, il cui inserito virale usato per la trasfezione corrisponde al genoma privato di porzioni differenti delle TR, mostrano un'efficienza intorno al 10%. La prova di immunofluorescenza per il cclDNA mostra un'efficienza intermedia. Il fatto che sia inferiore rispetto a quella osservata per pHG1 è probabilmente da imputare all'instabilità del costrutto contenente il genoma in forma bicatenaria, circolarizzato, oltre che alla criticità della fase preparativa dello stesso, prodotto di una reazione di ligazione fra l'inserito HI0 e gli oligonucleotidi TR0 e TRI. Il clone pHJ0 non ha dimostrato produzione di proteine capsidiche dopo trasfezione; si pensa che l'esito della prova sia da attribuire alla mancanza quasi totale delle TR.

Tale risultato porta a ipotizzare l'esistenza di elementi in cis, funzionali all'attività del promotore, che potrebbero mappare nella regione genomica compresa fra l'inserto HI0 e HJ0.

Per saggiare la capacità infettante dei cloni in analisi, le cellule trasfettate sono state sottoposte a lisi. Parte dell'analisi è stata finalizzata all'ottimizzazione del trattamento del lisato da utilizzare per l'infezione. A tale scopo il lisato è stato digerito con diverse combinazioni di DNasi ed RNasi e quantificato in real time PCR e RT-PCR. L'efficienza del trattamento con DNasi è stata confermata grazie all'utilizzo di un DNA esogeno a concentrazione nota che è stato completamente digerito dalla DNasi. I risultati relativi alla PCR e alla RT-PCR real time mostrano che i due enzimi possono essere usati contemporaneamente. La digestione consente di diminuire il segnale del DNA input aggiunto in fase di trasfezione che potrebbe alterare un'accurata analisi dei dati dopo infezione. Il trattamento con RNasi ha consentito di eliminare completamente il segnale dovuto al residuo post trasfezione. Si è ottenuto così un sistema in grado di valutare il segnale causato da particelle neoformate.

Per ogni clone è stato osservato l'andamento relativo al DNA e all'RNA dopo trasfezione e infezione mediante Real-Time PCR e RT-PCR.

Dall'analisi dei DNA virali dopo trasfezione con i diversi cloni genomici è evidente che il clone pHG1, contenente il genoma full-length mostra un incremento significativo del segnale tra le 2 e le 48 ore, mentre per pHJ0, clone completamente privo delle sequenze terminali, il segnale si riduce alle 48 ore; ciò è indicativo della degradazione del DNA responsabile del segnale al primo time-point. I cloni pHH1, pHH0 e pHI0, privi di porzioni delle ITR, hanno mostrato risultati intermedi fra quelli del clone genomico pHG1 e del clone pHJ0.

Per l'analisi degli RNA messaggeri sono stati determinati valori di ratio relativi all'attività trascrizionale rispetto al DNA stampo. Il segnale post-trasfezione indica una significativa attività trascrizionale a conferma dell'attività biologica dei cloni in analisi. Il segnale più alto risulta essere quello relativo a pHG1. Solo per il clone pHJ0 la quantità di RNA virali maturi post-trasfezione non aumenta, ma si mantiene costante dalle 2 ore alle 48 ore. Ciò è coerente con l'assenza di segnale in immunofluorescenza.

L'analisi quantitativa dopo infezione ha mostrato un aumento del segnale relativamente ad HG1 e, seppur in quantità inferiore ad HG0; ciò indica che la diversa configurazione delle sequenze terminali non influisce sull'attività infettante del clone. Per i cloni subgenomici non è stato osservato un aumento significativo dalle 2 ore alle 48 ore.

Da tali risultati è evidente il ruolo essenziale delle ITR in termini replicativi e trascrizionali. La quasi totale deplezione delle ITR che caratterizza pHJ0 rende il clone privo di capacità infettante e ne determina un diverso comportamento rispetto agli altri cloni. pHH0, pHH1 e pHI0 mostrano

un'attività trascrizionale post-trasfezione confrontabile con quella di pHG1, anche se il comportamento dopo infezione non indica la capacità da parte degli stessi di funzionare da cloni infettanti per l'analisi in vitro. Se ne deduce che la funzionalità virale è vincolata dall'integrità delle hairpin.

In parallelo è stato inoltre preso in analisi il costrutto cclDNA, che mima un intermedio replicativo del virus. A tale riguardo, si rivela interessante un confronto con il clone genomico pHG1. Per entrambe le analisi del DNA e degli RNA virali, il cclDNA evidenzia un incremento del segnale, seppur inferiore se confrontato con quello del clone pHG1; nel caso degli RNA virali il comportamento del cclDNA è più simile a quello di HG1; la quantificazione relativa fornisce aumento confrontabile con quello del clone genomico, anche se le quantità di virus implicate sono molto inferiori.

La verifica della presenza di capsidi neoformati è stata effettuata mediante microscopia elettronica. Infatti il campione esaminato relativo alle cellule trasfettate con pHG1 ha evidenziato la presenza dei tipici virioni del Parvovirus B19. Il clone pHG1 in cellule trasfettate ha mostrato un comportamento confrontabile con quello del virus wild type infettante una cellula.

In conclusione, il lavoro svolto ha riguardato l'analisi funzionale di cloni genomici e subgenomici di Parvovirus B19. Le cellule CD36⁺, generate mediante eritropoiesi in vitro, si sono mostrate pienamente permissive all'infezione da B19 e si sono rivelate un buon modello per l'ottenimento di progenie virale infettante dopo trasfezione con cloni genomici infettanti. Il saggio di eritropoiesi in vitro è un metodo flessibile, visto che si può adattare a CD34⁺ da diverse fonti. Successive analisi delle cellule CD36⁺ riguarderanno l'immortalizzazione della coltura primaria per ottenere una linea cellulare, che possa essere più stabile e adatta ai nostri studi. Altri autori hanno già usato a questo scopo il reagente Etil Metansulfonato [Munroe et al., 2000]. La mutagenesi con EMS dovrebbe stoppare il differenziamento, evitando la produzione di eritrociti maturi.

Lo studio sui cloni plasmidici del B19 ha evidenziato i componenti critici per l'infettività del parvovirus B19.

L'attività fosfolipasica della VP1u si è dimostrata cruciale per l'infettività dei cloni genomici full-length del B19. La generazione di diversi mutanti genomici ha confermato il ruolo essenziale della proteina NS nella replicazione virale e nella regolazione dell'attività trascrizionale.

Il sistema a disposizione si è rivelato altamente flessibile per la definizione di componenti critici per l'infettività virale e risulta promettente per una migliore comprensione della patogenesi virale.

Inoltre il confronto tra il clone genomico pHG1 e i cloni subgenomici, ha permesso parallelamente di saggiare il ruolo delle ITR nel ciclo virale a livello di replicazione, trascrizione,

impacchettamento del DNA genomico. Si ipotizza così che tali sequenze possano avere un analogo rilievo per il B19, come per altri Parvovirus.

Bibliografia

- Parvovirus infection, leukaemia, and immunodeficiency [letter]. *Lancet*. 1989. 1:101-2.
- Prospective study of human parvovirus (B19) infection in pregnancy. Public Health Laboratory Service Working Party on Fifth Disease. *Bmj*. 1990. 300:1166-70.
- Agbandje, M., S. Kajigaya, R. McKenna, N. S. Young, and M. G. Rossmann. 1994. The structure of human parvovirus B19 at 8 Å resolution. *Virology*. 203:106-15.
- Anand, A., E. S. Gray, T. Brown, J. P. Clewley, and B. J. Cohen. 1987. Human parvovirus infection in pregnancy and hydrops fetalis. *N Engl J Med*. 316:183-6.
- Anderson, L. J. 1987. Role of parvovirus B19 in human disease. *Pediatr Infect Dis J*. 6:711-8.
- Anderson, L. J., C. Tsou, R. A. Parker, T. L. Chorba, H. Wulff, P. Tattersall, and P. P. Mortimer. 1986. Detection of antibodies and antigens of human parvovirus B19 by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol*. 24:522-6.
- Anderson, M. J., P. G. Higgins, L. R. Davis, J. S. Willman, S. E. Jones, I. M. Kidd, J. R. Pattison, and D. A. Tyrrell. 1985. Experimental parvoviral infection in humans. *J Infect Dis*. 152:257-65.
- Anderson, M. J., S. E. Jones, S. P. Fisher-Hoch, E. Lewis, S. M. Hall, C. L. Bartlett, B. J. Cohen, P. P. Mortimer, and M. S. Pereira. 1983. Human parvovirus, the cause of erythema infectiosum (fifth disease)? *Lancet*. 1:1378.
- Anderson, M. J., I. M. Kidd, S. E. Jones, J. R. Pattison, M. H. Grieco, M. Lange, E. Buimovici-Klein, and L. Z. Cooper. 1985. Parvovirus infection and the acquired immunodeficiency syndrome [letter]. *Ann Intern Med*. 102:275.
- Anderson, M. J., E. Lewis, I. M. Kidd, S. M. Hall, and B. J. Cohen. 1984. An outbreak of erythema infectiosum associated with human parvovirus infection. *J Hyg (Lond)*. 93:85-93.
- R. K. Arni and R. J. Ward. 1996. Phospholipase A₂: a structural review. *Toxicon*. 34, 8: 827-841.
- Azzi, A., M. Morfini, and P. M. Mannucci. 1999. The transfusion-associated transmission of parvovirus B19. *Transfus Med Rev*. 13:194-204.
- Bansal, G. P., J. A. Hatfield, F. E. Dunn, A. A. Kramer, F. Brady, C. H. Riggin, M. S. Collett, K. Yoshimoto, S. Kajigaya, and N. S. Young. 1993. Candidate recombinant vaccine for human B19 parvovirus. *J Infect Dis*. 167:1034-44.

- Bartolomei Corsi, O., A. Azzi, M. Morfini, R. Fanci, and P. Rossi Ferrini. 1988. Human parvovirus infection in haemophiliacs first infused with treated clotting factor concentrates. *J Med Virol.* 25:165-70.
- Beard, C., J. St Amand, and C. R. Astell. 1989. Transient expression of B19 parvovirus gene products in COS-7 cells transfected with B19-SV40 hybrid vectors. *Virology.* 172:659-64.
- Bell, L. M., S. J. Naides, P. Stoffman, R. L. Hodinka, and S. A. Plotkin. 1989. Human parvovirus B19 infection among hospital staff members after contact with infected patients. *N Engl J Med.* 321:485-91.
- Berns, K. I., and R. A. Bohenzky. 1987. Adeno-associated viruses: an update. *Adv Virus Res.* 32:243-306.
- Blundell, M. C., and C. R. Astell. 1989. A GC-box motif upstream of the B19 parvovirus unique promoter is important for in vitro transcription. *J Virol.* 63:4814-23.
- Blundell, M. C., C. Beard, and C. R. Astell. 1987. In vitro identification of a B19 parvovirus promoter. *Virology.* 157:534-8.
- Brigati, D. J., D. Myerson, J. J. Leary, B. Spalholz, S. Z. Travis, C. K. Fong, G. D. Hsiung, and D. C. Ward. 1983. Detection of viral genomes in cultured cells and paraffin-embedded tissue sections using biotin-labeled hybridization probes. *Virology.* 126:32-50.
- Brown, C. S., J. W. Van Lent, J. M. Vlak, and W. J. Spaan. 1991. Assembly of empty capsids by using baculovirus recombinants expressing human parvovirus B19 structural proteins. *J Virol.* 65:2702-6.
- Brown, K. E., S. M. Anderson, and N. S. Young. 1993. Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B19 parvovirus. *Science.* 262:114-7.
- Brown, K. E., and B. J. Cohen. 1992. Haemagglutination by parvovirus B19. *J Gen Virol.* 73:2147-9.
- Brown, K. E., S. W. Green, J. Antunez de Mayolo, J. A. Bellanti, S. D. Smith, T. J. Smith, and N. S. Young. 1994. Congenital anaemia after transplacental B19 parvovirus infection. *Lancet.* 343:895-6.
- Brown, K. E., J. R. Hibbs, G. Gallinella, S. M. Anderson, E. D. Lehman, P. McCarthy, and N. S. Young. 1994. Resistance to parvovirus B19 infection due to lack of virus receptor (erythrocyte P antigen). *N Engl J Med.* 330:1192-6.
- Brown, K. E., J. Mori, B. J. Cohen, and A. M. Field. 1991. In vitro propagation of parvovirus B19 in primary foetal liver culture. *J Gen Virol.* 72:741-5.

- Brown, K. E., N. S. Young, and L. H. Barbosa. 2001. Parvovirus B19: implications for transfusion medicine. Summary of a workshop. *Transfusion*. 41:130-5.
- Brownell, A. I., D. A. McSwiggan, W. D. Cubitt, and M. J. Anderson. 1986. Aplastic and hypoplastic episodes in sickle cell disease and thalassaemia intermedia. *J Clin Pathol*. 39:121-4.
- Canaan S., Zadori Z., Ghomashchi F., et al. 2004. Interfacial enzymology of parvovirus phospholipase A2. *J. Of Biol. Chem*. 279: 14502-14508.
- Casadevall N., Vainchenker W. 1993. Erythropoiesis and its regulation. *Rev Prat*. 43: 1335-40.
- Cassinotti, P., G. Siegl, B. A. Michel, and P. Bruhlmann. 1998. Presence and significance of human parvovirus B19 DNA in synovial membranes and bone marrow from patients with arthritis of unknown origin. *J Med Virol*. 56:199-204.
- Chorba, T., P. Coccia, R. C. Holman, P. Tattersall, L. J. Anderson, J. Sudman, N. S. Young, E. Kurczynski, U. M. Saarinen, R. Moir, and et al. 1986. The role of parvovirus B19 in aplastic crisis and erythema infectiosum (fifth disease). *J Infect Dis*. 154:383-93.
- Clewley, J. P. 1984. Biochemical characterization of a human parvovirus. *J Gen Virol*. 65:241-5.
- Clewley, J. P. 1985. Detection of human parvovirus using a molecularly cloned probe. *J Med Virol*. 15:173-81.
- Clewley, J. P., B. J. Cohen, and A. M. Field. 1987. Detection of parvovirus B19 DNA, antigen, and particles in the human fetus. *J Med Virol*. 23:367-76.
- Cohen, B. J., M. M. Buckley, J. P. Clewley, V. E. Jones, A. H. Puttick, and R. K. Jacoby. 1986. Human parvovirus infection in early rheumatoid and inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis*. 45:832-8.
- Cohen, B. J., A. M. Field, J. Mori, K. E. Brown, J. P. Clewley, J. St Amand, and C. R. Astell. 1995. Morphology and antigenicity of recombinant B19 parvovirus capsids expressed in transfected COS-7 cells. *J Gen Virol*. 76:1233-7.
- Cossart, Y. E., A. M. Field, B. Cant, and D. Widdows. 1975. Parvovirus-like particles in human sera. *Lancet*. 1:72-3.
- Cotmore, S. F., and P. Tattersall. 1987. The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates. *Adv Virus Res*. 33:91-174.
- Cotmore, S. F., and P. Tattersall. 1984. Characterization and molecular cloning of a human parvovirus genome. *Science*. 226:1161-5.

- de Freitas, R. B., D. Wong, F. Boswell, M. F. de Miranda, A. C. Linhares, J. Shirley, and U. Desselberger. 1990. Prevalence of human parvovirus (B19) and rubella virus infections in urban and remote rural areas in northern Brazil. *J Med Virol.* 32:203-8.
- Deiss, V., J. D. Tratschin, M. Weitz, and G. Siegl. 1990. Cloning of the human parvovirus B19 genome and structural analysis of its palindromic termini. *Virology.* 175:247-54.
- de Wolf Joost Th.M, Muller Erik W., Hendriks Dick H., Halie Ruud M., and Vellenga Edo. 1994. Mast Cell Growth Factor Modulates CD36 Antigen Expression on Erythroid Progenitors From Human Bone Marrow and Peripheral Blood Associated with Ongoing Differentiation. *Blood*, Vol 84 , No 1: pp 59-64.
- Dodd, R. Y. 2000. Current viral risks of blood and blood products. *Ann Med.* 32:469-74.
- Doerig, C., P. Beard, and B. Hirt. 1987. A transcriptional promoter of the human parvovirus B19 active in vitro and in vivo. *Virology.* 157:539-42.
- Doerig, C., B. Hirt, J. P. Antonietti, and P. Beard. 1990. Nonstructural protein of parvoviruses B19 and minute virus of mice controls transcription. *J Virol.* 64:387-96.
- Doran, H. M., and A. J. Teall. 1988. Neutropenia accompanying erythroid aplasia in human parvovirus infection. *Br J Haematol.* 69:287-8.
- Dorsch Simone, Gerhard Liebisch, Barbel Kaufmann, Philipp von Landenberg, Jorg H.
- Hoffmann, Wolfgang Drobnik, and Susan Modrow. 2002. The VP1 Unique Region of Parvovirus B19 and its constituent phospholipase A2-like activity. *Journal of Virology*, p.2014-2018.
- Duncan, J. R., C. B. Potter, M. D. Cappellini, J. B. Kurtz, M. J. Anderson, and D. J. Weatherall. 1983. Aplastic crisis due to parvovirus infection in pyruvate kinase deficiency. *Lancet.* 2:14-6.
- Enders, G., J. Dotsch, J. Bauer, W. Nutzenadel, H. Hengel, D. Haffner, G. Schalasta, K. Searle, and K. E. Brown. 1998. Life-threatening parvovirus B19-associated myocarditis and cardiac transplantation as possible therapy: two case reports. *Clin Infect Dis.* 26:355-8.
- Erdman, D. D., E. L. Durigon, Q. Y. Wang, and L. J. Anderson. 1996. Genetic diversity of human parvovirus B19: sequence analysis of the VP1/VP2 gene from multiple isolates. *J Gen Virol.* 77:2767-74.
- Erdman, D. D., M. J. Usher, C. Tsou, E. O. Caul, G. W. Gary, S. Kajigaya, N. S. Young, and L. J. Anderson. 1991. Human parvovirus B19 specific IgG, IgA, and IgM antibodies and DNA in serum specimens from persons with erythema infectiosum. *J Med Virol.* 35:110-5.

- Farr Glen A., and Peter Tattersall. 2004. A conserved leucine that constricts the pore through the capsid fivefold cylinder plays a central role in parvoviral infection. *Virology* 323, 243-256.
- Fauquet, C. M., and M. A. Mayo. 2001. The 7th ICTV report. *Arch Virol.* 146:189-94.
- Field, A. M., B. J. Cohen, K. E. Brown, J. Mori, J. P. Clewley, J. P. Nascimento, and N. F. Hallam. 1991. Detection of B19 parvovirus in human fetal tissues by electron microscopy. *J Med Virol.* 35:85-95.
- Foreman, N. K., A. Oakhill, and E. O. Caul. 1988. Parvovirus-associated thrombocytopenic purpura [letter]. *Lancet.* 2:1426-7.
- Freyssonier J.M., C. Lecoq-Lafon, S. Amsellem, F. Picard, R. Ducroq, P. Mayeux, C.Lacombe and S. Fichelson. 1999. Purification, amplification and characterization of a population of human erythroid progenitors. *British Journal of Hematology*, 106, 912-922.
- Frickhofen, N., J. L. Abkowitz, M. Safford, J. M. Berry, J. Antunez-de-Mayolo, A. Astrow, R. Cohen, I. Halperin, L. King, D. Mintzer, and et al. 1990. Persistent B19 parvovirus infection in patients infected with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1): a treatable cause of anemia in AIDS. *Ann Intern Med.* 113:926-33.
- Gahr, M., A. Pekrun, and H. Eiffert. 1991. Persistence of parvovirus B19-DNA in blood of a child with severe combined immunodeficiency associated with chronic pure red cell aplasia. *Eur J Pediatr.* 150:470-2.
- Gallinella, G., E. Manaresi, S. Venturoli, G. L. Grazi, M. Musiani, and M. Zerbini. 1999. Occurrence and clinical role of active parvovirus B19 infection in transplant recipients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 18:811-3.
- Gallinella, G., E. Manaresi, E. Zuffi, S. Venturoli, L. Bonsi, G. P. Bagnara, M. Musiani, and M. Zerbini. 2000. Different patterns of restriction to B19 parvovirus replication in human blast cell lines. *Virology.* 278:361-7.
- Gallinella, G., M. Zerbini, M. Musiani, S. Venturoli, G. Gentilomi, and E. Manaresi. 1997. Quantitation of parvovirus B19 DNA sequences by competitive PCR: differential hybridization of the amplicons and immunoenzymatic detection on microplate. *Mol Cell Probes.* 11:127-33.
- Gareus, R., A. Gigler, A. Hemauer, M. Leruez-Ville, F. Morinet, H. Wolf, and S. Modrow. 1998. Characterization of cis-acting and NS1 protein-responsive elements in the p6 promoter of parvovirus B19. *J Virol.* 72:609-16.

- Garcon Loic, Catherine Lacout, Fedor Svinartchouk, Jean-Pierre Le Couedic, Jean-Luc Villevall, William Vainchenker. 2005. Gfi-B plays a critical role in terminal differentiation of normal and transformed erythroid progenitor cells. *Blood*, 15 february. Volume 105, Number 4, 1448-1455.
- Gentilomi, G., M. Musiani, M. Zerbini, G. Gallinella, S. Venturoli, and E. Manaresi. 1997. Dot immunoperoxidase assay for detection of parvovirus B19 antigens in serum samples. *J Clin Microbiol.* 35:1575-8.
- Gentilomi, G., M. Zerbini, G. Gallinella, S. Venturoli, E. Manaresi, R. Morandi, and M. Musiani. 1998. B19 parvovirus induced fetal hydrops: rapid and simple diagnosis by detection of B19 antigens in amniotic fluids. *Prenat Diagn.* 18:363-8.
- Gentilomi, G., M. Zerbini, M. Musiani, G. Gallinella, D. Gibellini, S. Venturoli, M. C. Re, S. Pileri, C. Finelli, and M. La Placa. 1993. In situ detection of B19 DNA in bone marrow of immunodeficient patients using a digoxigenin-labelled probe. *Mol Cell Probes.* 7:19-24.
- Gershon Harriet. 2001. Erythrocytes. *Encyclopedia of Life Sciences.*
- Giarratana Marie-Catherine, Kobari Ladan, Lapillonne Helene, Chalmers David, Kiger
- Laurent, Cynober Therese, Marden Micheal C, Wajcman Henri & Douay Luc. 2005. Ex vivo generation of fully mature human red blood cells from hematopoietic stem cells. *Nature Biotechnology*, Volume 23, Number 1, January.
- Gillespie, S. M., M. L. Cartter, S. Asch, J. B. Rokos, G. W. Gary, C. J. Tsou, D. B. Hall, L.
- J. Anderson, and E. S. Hurwitz. 1990. Occupational risk of human parvovirus B19 infection for school and day- care personnel during an outbreak of erythema infectiosum [see comments]. *Jama.* 263:2061-5.
- Girod A., Wobus CE, Zadori Z, et al. 2002 The VP1 capsid protein of adenoassociated virus type 2 is carrying a phospholipase A2 domain required for virus infectivity. *J. Gen. Virol.* 83: 973- 978.
- Graeve, J. L., P. A. de Alarcon, and S. J. Naides. 1989. Parvovirus B19 infection in patients receiving cancer chemotherapy: the expanding spectrum of disease. *Am J Pediatr Hematol Oncol.* 11:441-4.
- Gupta AD, Samoszuk MK, Papayannopoulou T, Stamatoyannopoulos G. , 1985. "SFL 23.6: a monoclonal antibody reactive with CFU-E, erythroblasts, and erythrocytes". *Blood*; 66: 522-6.

- Hamon, M. D., A. C. Newland, and M. J. Anderson. 1988. Severe aplastic anaemia after parvovirus infection in the absence of underlying haemolytic anaemia [letter]. *J Clin Pathol.* 41:1242.
- Hanada, T., K. Koike, C. Hirano, T. Takeya, T. Suzuki, Y. Matsunaga, and H. Takita. 1989. Childhood transient erythroblastopenia complicated by thrombocytopenia and neutropenia. *Eur J Haematol.* 42:77-80.
- Hanada, T., K. Koike, T. Takeya, T. Nagasawa, Y. Matsunaga, and H. Takita. 1988. Human parvovirus B19-induced transient pancytopenia in a child with hereditary spherocytosis. *Br J Haematol.* 70:113-5.
- Harris, J. W. 1992. Parvovirus B19 for the hematologist. *Am J Hematol.* 39:119-30.
- Heegaard, E. D., N. A. Peterslund, and A. Hornsleth. 1995. Parvovirus B19 infection associated with encephalitis in a patient suffering from malignant lymphoma. *Scand J Infect Dis.* 27:631-3.
- Heegaard, E. D., S. Rosthoj, B. L. Petersen, S. Nielsen, F. Karup Pedersen, and A. Hornsleth. 1999. Role of parvovirus B19 infection in childhood idiopathic thrombocytopenic purpura. *Acta Paediatr.* 88:614-7.
- Heegaard Erik D. and Kevin E. Brown. 2002. Human Parvovirus B19. *Clinical Microbiology Review* : 485-505.
- Hirt, B. Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cells. 1967. *J. Mol. Biol.* 26: 365-369.
- Horowitz, B., and E. Ben-Hur. 2000. Efforts in minimizing risk of viral transmission through viral inactivation. *Ann Med.* 32:475-84.
- Joost Th.M. de Wolf, Erik W. Muller, Dick H. Hendriks, Ruud M. Halie, and Edo Vellenga. 1994. Mast Cell Growth Factor Modulates CD36 Antigen Expression on Erythroid Progenitors From Human Bone Marrow and Peripheral Blood Associated with Ongoing Differentiation. *Blood*, Vol 84 , No 1: pp 59-64.
- Jordan, J., B. Tiangco, J. Kiss, and W. Koch. 1998. Human parvovirus B19: prevalence of viral DNA in volunteer blood donors and clinical outcomes of transfusion recipients. *Vox Sang.* 75:97-102.
- Kajigaya, S., H. Fujii, A. Field, S. Anderson, S. Rosenfeld, L. J. Anderson, T. Shimada, and N. S. Young. 1991. Self-assembled B19 parvovirus capsids, produced in a baculovirus system, are antigenically and immunogenically similar to native virions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:4646-50.

- Kajigaya, S., T. Shimada, S. Fujita, and N. S. Young. 1989. A genetically engineered cell line that produces empty capsids of B19 (human) parvovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86:7601-5.
- Kawase, M., M. Momoeda, N.S. Young, and S. Kajigaya. 1995. Most of the VP1 unique region of B19 parvovirus is on the capsid surface. *Virology* . 211: 359-366.
- Kelleher, J. F., N. L. Luban, P. P. Mortimer, and T. Kamimura. 1983. Human serum "parvovirus": a specific cause of aplastic crisis in children with hereditary spherocytosis. *J Pediatr.* 102:720-2.
- Kim, E. C., E. L. Durigon, D. D. Erdman, and L. J. Anderson. 1994. Chemiluminescent microwell hybridization assay for direct detection of human parvovirus B19 DNA. *J Virol Methods.* 50:349-54.
- Kinney, J. S., L. J. Anderson, J. Farrar, R. A. Strikas, M. L. Kumar, R. M. Kliegman, J. L. Sever, E. S. Hurwitz, and R. K. Sikes. 1988. Risk of adverse outcomes of pregnancy after human parvovirus B19 infection. *J Infect Dis.* 157:663-7.
- Klouda, P. T., S. A. Corbin, B. A. Bradley, B. J. Cohen, and A. D. Woolf. 1986. HLA and acute arthritis following human parvovirus infection. *Tissue Antigens.* 28:318-9.
- Koch, W. C., and S. P. Adler. 1990. Detection of human parvovirus B19 DNA by using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 28:65-9.
- Kurtzman, G., N. Frickhofen, J. Kimball, D. W. Jenkins, A. W. Nienhuis, and N. S. Young. 1989. Pure red-cell aplasia of 10 years duration due to persistent parvovirus B19 infection and its cure with immunoglobulin therapy [see comments]. *N Engl J Med.* 321:519-23.
- Kurtzman, G. J., B. Cohen, P. Meyers, A. Amunullah, and N. S. Young. 1988. Persistent B19 parvovirus infection as a cause of severe chronic anaemia in children with acute lymphocytic leukaemia. *Lancet.* 2:1159-62.
- Kurtzman, G. J., B. J. Cohen, A. M. Field, R. Oseas, R. M. Blaese, and N. S. Young. 1989. Immune response to B19 parvovirus and an antibody defect in persistent viral infection. *J Clin Invest.* 84:1114-23.
- Kurtzman, G. J., K. Ozawa, B. Cohen, G. Hanson, R. Oseas, and N. S. Young. 1987. Chronic bone marrow failure due to persistent B19 parvovirus infection. *N Engl J Med.* 317:287-94.
- Landsdorp Peter M. and Dragowska Wieslawa. 1995. Long-term Erythropoiesis from Constant Numbers of CD34+ Cells in Serum-free Cultures Initiated with Highly Purified Progenitor Cells from Human Bone Marrow. *J. Exp. Med.,* Volume 175, June, 1501-1509.

- Lefrere, J. J., and H. Bourgeois. 1986. Human parvovirus associated with erythroblastopenia in iron deficiency anaemia [letter]. *J Clin Pathol.* 39:1277-8.
- Lefrere, J. J., A. M. Courouce, J. P. Soulier, M. P. Cordier, M. C. Guesne Girault, C. Polonovski, and A. Bensman. 1986. Henoch-Schonlein purpura and human parvovirus infection [letter]. *Pediatrics.* 78:183-4.
- Liu, J. M., H. Fujii, S. W. Green, N. Komatsu, N. S. Young, and T. Shimada. 1991. Indiscriminate activity from the B19 parvovirus p6 promoter in nonpermissive cells. *Virology.* 182:361-4.
- Liu, J. M., S. W. Green, Y. S. Hao, K. T. McDonagh, N. S. Young, and T. Shimada. 1991. Upstream sequences within the terminal hairpin positively regulate the P6 promoter of B19 parvovirus. *Virology.* 185:39-47.
- Liu, J. M., S. W. Green, T. Shimada, and N. S. Young. 1992. A block in full-length transcript maturation in cells nonpermissive for B19 parvovirus. *J Virol.* 66:4686-92.
- Lu Jun, Ning Zhi, Susan Wong, and Kevin Brown. 2006. Activation of Synoviocytes by the Secreted Phospholipase A2 Motif in the VP1-Unique Region of Parvovirus B19 Minor Capsid Protein. *Journal of Infectious Diseases,* 93 (15 February).
- Luo, W., and C. R. Astell. 1993. A novel protein encoded by small RNAs of parvovirus B19. *Virology.* 195:448-55.
- Maguer-Satta V. 2004. In vitro Use of Primary human Hematopoietic Cells as a Model to Investigate the Regulation of Erythropoiesis. *Transfusion Medicine and Hemotherapy;* 31: 33-40.
- Manaresi, E., G. Gallinella, M. Zerbini, S. Venturoli, G. Gentilomi, and M. Musiani. 1999. IgG immune response to B19 parvovirus VP1 and VP2 linear epitopes by immunoblot assay. *J Med Virol.* 57:174-8.
- Manaresi, E., E. Zuffi, G. Gallinella, G. Gentilomi, M. Zerbini, and M. Musiani. 2001. Differential IgM response to conformational and linear epitopes of parvovirus B19 VP1 and VP2 structural proteins. *J Med Virol.* 64:67-73.
- McOmish, F., P. L. Yap, A. Jordan, H. Hart, B. J. Cohen, and P. Simmonds. 1993. Detection of parvovirus B19 in donated blood: a model system for screening by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 31:323-8.
- Migliaccio Giovanni, Anna Rita Migliaccio, Maurice L.Druzin, Patricia-Jane V. Giardina, Krisztina M. Zsebo, and John W. Adamson. 1992. Long-Term generation of Colony-Forming Cells in liquid culture of CD34+ cord blood cells in the presence of recombinant humna stem cells factor. *Blood;* Vol 79, No 10: 2620-2627.

- Migliaccio Giovanni, Roberta Di Pietro, Viviana di Giacomo, Angela Di Baldassarre, Anna Rita Migliaccio, Liliana Maccioni, Renzo Galanello, and Thalia Papayannopoulou. 2002. In vitro Mass Production of Human erythroid cells from the blood of normal donors and of thalassemic patients. *Blood Cells, Molecules and Disease*. 28(2): 169-180.
- Miyagawa, E., T. Yoshida, H. Takahashi, K. Yamaguchi, T. Nagano, Y. Kiriyama, K. Okochi, and H. Sato. 1999. Infection of the erythroid cell line, KU812Ep6 with human parvovirus B19 and its application to titration of B19 infectivity. *J Virol Methods*. 83:45-54.
- Koichi Miyamura, Sachiko Kajigaya, Mikio Momoeda, Sandra J. Smith-Grill, and Neal S. Young. 1994. Parvovirus particles as platforms for protein presentation. *Biochemistry*. 91:8507-8511.
- Morey, A. L., D. J. Ferguson, and K. A. Fleming. 1993. Ultrastructural features of fetal erythroid precursors infected with parvovirus B19 in vitro: evidence of cell death by apoptosis. *J Pathol*. 169:213-20.
- Morey, A. L., and K. A. Fleming. 1992. Immunophenotyping of fetal haemopoietic cells permissive for human parvovirus B19 replication in vitro. *Br J Haematol*. 82:302-9.
- Morey, A. L., J. W. Keeling, H. J. Porter, and K. A. Fleming. 1992. Clinical and histopathological features of parvovirus B19 infection in the human fetus. *Br J Obstet Gynaecol*. 99:566-74.
- Mori, J., P. Beattie, D. W. Melton, B. J. Cohen, and J. P. Clewley. 1987. Structure and mapping of the DNA of human parvovirus B19. *J Gen Virol*. 68:2797-806.
- Morinet, F., L. D'Auriol, J. D. Tratschin, and F. Galibert. 1989. Expression of the human parvovirus B19 protein fused to protein A in *Escherichia coli*: recognition by IgM and IgG antibodies in human sera. *J Gen Virol*. 70:3091-7.
- Morita E., Tada K., Chisaka H., Asao H., Sato H., Yaegashi N., Sugamura K. 2001. Human parvovirus B19 induces cell cycle arrest at G(2) phase with accumulation of mitotic cyclins. *J Virol*; 75: 7555-63.
- Mortimer, P. P., R. K. Humphries, J. G. Moore, R. H. Purcell, and N. S. Young. 1983. A human parvovirus-like virus inhibits haematopoietic colony formation in vitro. *Nature*. 302:426-9.
- Munakata Y., Saito-Ito T., Kumura-Ishii K., Huang J., Kodera T., Ishii T., Hirabayashi Y., Koyanagi Y., Sasaki T. 2005. Ku80 autoantigen as a cellular coreceptor for human parvovirus B19 infection. *Blood*; 106, 10: 3449-3456.

- Munroe RJ, Bergstrom RA, Zheng QY, Libby B, Smith R, John SW, Schimenti KJ, Browning VL, Schimenti JC. 2000. Mouse mutants from chemically mutagenized embryonic stem cells. *Nature Genetics.*; 24: 318-321.
- Munshi, N. C., S. Zhou, M. J. Woody, D. A. Morgan, and A. Srivastava. 1993. Successful replication of parvovirus B19 in the human megakaryocytic leukemia cell line MB-02. *J Virol.* 67:562-6.
- Musiani, M., A. Azzi, M. Zerbini, D. Gibellini, S. Venturoli, K. Zakrzewska, M. C. Re, G. Gentilomi, G. Gallinella, and M. La Placa. 1993. Nested polymerase chain reaction assay for the detection of B19 parvovirus DNA in human immunodeficiency virus patients. *J Med Virol.* 40:157-60.
- Musiani, M., M. Zerbini, G. Gentilomi, G. Roderigo, V. De Rosa, D. Gibellini, S. Venturoli, and G. Gallinella. 1995. Persistent B19 parvovirus infections in haemophilic HIV-1 infected patients. *J Med Virol.* 46:103-8.
- Musiani, M., M. Zerbini, D. Gibellini, G. Gentilomi, S. Venturoli, G. Gallinella, E. Ferri, and S. Girotti. 1991. Chemiluminescence dot blot hybridization assay for detection of B19 parvovirus DNA in human sera. *J Clin Microbiol.* 29:2047-50.
- Naides, S. J., Y. V. Karetnyi, L. L. Cooling, R. S. Mark, and A. N. Langnas. 1996. Human parvovirus B19 infection and hepatitis [letter; comment]. *Lancet.* 347:1563-4.
- Nakahata T, Okumura N. 1994. Cell surface antigen expression in human erythroid progenitors: erythroid and megakaryocytic markers. *Leuk Lymphoma*, May; 13 (5-6): 401-9.
- Nascimento, J. P., M. M. Buckley, K. E. Brown, and B. J. Cohen. 1990. The prevalence of antibody to human parvovirus B19 in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 32:41-5.
- Neild, G., M. Anderson, S. Hawes, and B. T. Colvin. 1986. Parvovirus infection after renal transplant [letter]. *Lancet.* 2:1226-7.
- Nguyen QT, Wong S, Heegaard ED, Brown KE. 2002. Identification and characterization of a second novel human erythrovirus variant, A6. *Virology*; 301: 374-80.
- Okumura Nobuo, Tsuji Kohichiro, and Nakahata Tatsutoshi. 1992. Changes in Cell Surface Antigen Expressions During Proliferation and Differentiation of Human Erythroid Progenitors. *Blood*, vol 80, No 3: pp 642-650.
- Ogawa Makio. 1993. Differentiation and Proliferation of Hematopoietic Stem Cells. *Blood*, Vol 81, No11, pp 2844-2853.

- O'Sullivan, M. G., D. K. Anderson, J. A. Goodrich, H. Tulli, S. W. Green, N. S. Young, and K. E. Brown. 1997. Experimental infection of cynomolgus monkeys with simian parvovirus. *J Virol.* 71:4517-21.
- Ozawa, K., J. Ayub, Y. S. Hao, G. Kurtzman, T. Shimada, and N. Young. 1987. Novel transcription map for the B19 (human) pathogenic parvovirus. *J Virol.* 61:2395-406.
- Ozawa, K., J. Ayub, S. Kajigaya, T. Shimada, and N. Young. 1988. The gene encoding the nonstructural protein of B19 (human) parvovirus may be lethal in transfected cells. *J Virol.* 62:2884-9.
- Ozawa, K., J. Ayub, and N. Young. 1988. Functional mapping of the genome of the B19 (human) parvovirus by in vitro translation after negative hybrid selection. *J Virol.* 62:2508-11.
- Ozawa, K., J. Ayub, and N. Young. 1988. Translational regulation of B19 parvovirus capsid protein production by multiple upstream AUG triplets. *J Biol Chem.* 263:10922-6.
- Ozawa, K., G. Kurtzman, and N. Young. 1987. Productive infection by B19 parvovirus of human erythroid bone marrow cells in vitro. *Blood.* 70:384-91.
- Ozawa, K., G. Kurtzman, and N. Young. 1986. Replication of the B19 parvovirus in human bone marrow cell cultures. *Science.* 233:883-6.
- Ozawa, K., and N. Young. 1987. Characterization of capsid and noncapsid proteins of B19 parvovirus propagated in human erythroid bone marrow cell cultures. *J Virol.* 61:2627-30.
- Pardi, D. S., Y. Romero, L. E. Mertz, and D. D. Douglas. 1998. Hepatitis-associated aplastic anemia and acute parvovirus B19 infection: a report of two cases and a review of the literature. *Am J Gastroenterol.* 93:468-70.
- Pattison, J. R., S. E. Jones, J. Hodgson, L. R. Davis, J. M. White, C. E. Stroud, and L. Murtaza. 1981. Parvovirus infections and hypoplastic crisis in sickle-cell anaemia. *Lancet.* 1:664-5.
- Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29:e45.
- Porter, H. J., T. Y. Khong, M. F. Evans, V. T. Chan, and K. A. Fleming. 1988. Parvovirus as a cause of hydrops fetalis: detection by in situ DNA hybridisation. *J Clin Pathol.* 41:381-3.
- Porter, H. J., A. M. Quantrill, and K. A. Fleming. 1988. B19 parvovirus infection of myocardial cells [letter]. *Lancet.* 1:535-6.

- Potter, C. G., A. C. Potter, C. S. Hatton, H. M. Chapel, M. J. Anderson, J. R. Pattison, D. A. Tyrrell, P. G. Higgins, J. S. Willman, H. F. Parry, and et al. 1987. Variation of erythroid and myeloid precursors in the marrow and peripheral blood of volunteer subjects infected with human parvovirus (B19). *J Clin Invest.* 79:1486-92.
- Prowse, C., C. A. Ludlam, and P. L. Yap. 1997. Human parvovirus B19 and blood products. *Vox Sang.* 72:1-10.
- Rodis, J. F., D. L. Quinn, G. W. Gary, Jr., L. J. Anderson, S. Rosengren, M. L. Cartter, W. A. Campbell, and A. M. Vintzileos. 1990. Management and outcomes of pregnancies complicated by human B19 parvovirus infection: a prospective study. *Am J Obstet Gynecol.* 163:1168-71.
- Rosenfeld, S. J., K. Yoshimoto, S. Kajigaya, S. Anderson, N. S. Young, A. Field, P. Warrener, G. Bansal, and M. S. Collett. 1992. Unique region of the minor capsid protein of human parvovirus B19 is exposed on the virion surface. *J Clin Invest.* 89:2023-9.
- Saarinen, U. M., T. L. Chorba, P. Tattersall, N. S. Young, L. J. Anderson, E. Palmer, and P. F. Coccia. 1986. Human parvovirus B19-induced epidemic acute red cell aplasia in patients with hereditary hemolytic anemia. *Blood.* 67:1411-7.
- Saikawa, T., S. Anderson, M. Momoeda, S. Kajigaya, and N. S. Young. 1993. Neutralizing linear epitopes of B19 parvovirus cluster in the VP1 unique and VP1-VP2 junction regions. *J Virol.* 67:3004-9.
- Saldanha, J., and P. Minor. 1996. Detection of human parvovirus B19 DNA in plasma pools and blood products derived from these pools: implications for efficiency and consistency of removal of B19 DNA during manufacture. *Br J Haematol.* 93:714-9.
- Sato, H., J. Hirata, N. Kuroda, H. Shiraki, Y. Maeda, and K. Okochi. 1991. Identification and mapping of neutralizing epitopes of human parvovirus B19 by using human antibodies. *J Virol.* 65:5485-90.
- Sawada K., Krantz SB, Kans JS, Dessypris EN, Sawyer S., Glick AD, Civin CI. 1987. Purification of human erythroid colony-forming units and demonstration of specific binding of erythropoietin. *J Clin Invest;* 80: 357-66.
- Schwarz, T. F., L. G. Gurtler, G. Zoulek, F. Deinhardt, and M. Roggendorf. 1989. Seroprevalence of human parvovirus B19 infection in Sao Tome and Principe, Malawi and Mascarene Islands. *Zentralbl Bakteriол.* 271:231-6.
- Schwarz, T. F., A. Nerlich, B. Hottentrager, G. Jager, I. Wiest, S. Kantimm, H. Roggendorf, M. Schultz, K. P. Gloning, T. Schramm, and et al. 1991. Parvovirus B19 infection of the fetus. Histology and in situ hybridization. *Am J Clin Pathol.* 96:121-6.

- Schwarz, T. F., S. Serke, B. Hottentrager, A. von Brunn, H. Baurmann, A. Kirsch, W. Stolz, D. Huhn, F. Deinhardt, and M. Roggendorf. 1992. Replication of parvovirus B19 in hematopoietic progenitor cells generated in vitro from normal human peripheral blood. *J Virol.* 66:1273-6.
- Serjeant, G. R., J. M. Topley, K. Mason, B. E. Serjeant, J. R. Pattison, S. E. Jones, and R. Mohamed. 1981. Outbreak of aplastic crises in sickle cell anaemia associated with parvovirus-like agent. *Lancet.* 2:595-7.
- Shade, R. O., M. C. Blundell, S. F. Cotmore, P. Tattersall, and C. R. Astell. 1986. Nucleotide sequence and genome organization of human parvovirus B19 isolated from the serum of a child during aplastic crisis. *J Virol.* 58:921-36.
- Shimomura, S., N. Komatsu, N. Frickhofen, S. Anderson, S. Kajigaya, and N. S. Young. 1992. First continuous propagation of B19 parvovirus in a cell line. *Blood.* 79:18-24.
- Shimomura, S., S. Wong, K. E. Brown, N. Komatsu, S. Kajigaya, and N. S. Young. 1993. Early and late gene expression in UT-7 cells infected with B19 parvovirus. *Virology.* 194:149-56.
- Shneerson, J. M., P. P. Mortimer, and E. M. Vandervelde. 1980. Febrile illness due to a parvovirus. *Br Med J.* 280:1580.
- Siegl, G., and P. Cassinotti. 1998. Presence and significance of parvovirus B19 in blood and blood products. *Biologicals.* 26:89-94.
- Smith, M. A., N. S. Shah, and J. S. Lobel. 1989. Parvovirus B19 infection associated with reticulocytopenia and chronic autoimmune hemolytic anemia. *Am J Pediatr Hematol Oncol.* 11:167-9.
- Soderlund Maria, Kevin E. Brown, Olli Meurmann, and Klaus Hedman. 1992. Prokaryotic Expression of a VP1 Polypeptide antigen for diagnosis by a human Parvovirus B19 Antibody Enzyme ImmunoAssay. *Journal of Clinical Microbiology.* 305-311.
- Soderlund, M., C. S. Brown, W. J. Spaan, L. Hedman, and K. Hedman. 1995. Epitope type-specific IgG responses to capsid proteins VP1 and VP2 of human parvovirus B19. *J Infect Dis.* 172:1431-6.
- Soderlund, M., R. von Essen, J. Haapasaari, U. Kiistala, O. Kiviluoto, and K. Hedman. 1997. Persistence of parvovirus B19 DNA in synovial membranes of young patients with and without chronic arthropathy. *Lancet.* 349:1063-5.
- Srivastava, A., E. Bruno, R. Briddell, R. Cooper, C. Srivastava, K. van Besien, and R. Hoffman. 1990. Parvovirus B19-induced perturbation of human megakaryocytopoiesis in vitro. *Blood.* 76:1997-2004.

- Srivastava, A., and L. Lu. 1988. Replication of B19 parvovirus in highly enriched hematopoietic progenitor cells from normal human bone marrow. *J Virol.* 62:3059-63.
- Srivastava, C. H., S. Zhou, N. C. Munshi, and A. Srivastava. 1992. Parvovirus B19 replication in human umbilical cord blood cells. *Virology.* 189(2):456-61.
- St Amand, J., and C. R. Astell. 1993. Identification and characterization of a family of 11-kDa proteins encoded by the human parvovirus B19. *Virology.* 192:121-31.
- St Amand, J., C. Beard, K. Humphries, and C. R. Astell. 1991. Analysis of splice junctions and in vitro and in vivo translation potential of the small, abundant B19 parvovirus RNAs. *Virology.* 183:133-42.
- Sugawara Hiroyuki, Reiko Motokawa, Hideki Abe, Miki Yamaguchi, Yoshiko Yamada-Ohnishi, Junichi Hirayama, Hidekatsu Sakata, Shinichiro Sato, Naoki Kamo, Kenji Ikebuchi, and Hisami Ikeda. 2001. Inactivation of parvovirus B19 in coagulation factor concentrates by UVC radiation: assessment by an in vitro infectivity assay using CFU-E derived from peripheral blood CD34+ cells. *Transfusion;* 41: 456-61.
- Summers, J., S. E. Jones, and M. J. Anderson. 1983. Characterization of the genome of the agent of erythrocyte aplasia permits its classification as a human parvovirus. *J Gen Virol.* 64:2527-32.
- Tabor, E., M. Y. Yu, I. Hewlett, and J. S. Epstein. 2000. Summary of a workshop on the implementation of NAT to screen donors of blood and plasma for viruses. *Transfusion.* 40:1273-5.
- Takahashi, T., K. Ozawa, K. Mitani, K. Miyazono, S. Asano, and F. Takaku. 1989. B19 parvovirus replicates in erythroid leukemic cells in vitro. *J Infect Dis.* 160(3):548-9.
- Takahashi, T., K. Ozawa, K. Takahashi, S. Asano, and F. Takaku. 1990. Susceptibility of human erythropoietic cells to B19 parvovirus in vitro increases with differentiation. *Blood.* 75(3):603-10.
- Takahashi, T., K. Ozawa, K. Takahashi, Y. Okuno, Y. Muto, F. Takaku, and S. Asano. 1993. DNA replication of parvovirus B19 in a human erythroid leukemia cell line (JK-1) in vitro. *Arch Virol.* 131:201-8.
- Takahashi, Y., C. Murai, S. Shibata, Y. Munakata, T. Ishii, K. Ishii, T. Saitoh, T. Sawai, K. Sugamura, and T. Sasaki. 1998. Human parvovirus B19 as a causative agent for rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:8227-32.
- Torok, T. J. 1990. Human parvovirus B19 infections in pregnancy. *Pediatr Infect Dis J.* 9:772-6.

- Torok, T. J. 1992. Parvovirus B19 and human disease. *Adv Intern Med.* 37:431-55.
- Tullis G.E., Burger L.R., Pintel D.J. 1993. The minor capsid protein VP1 of autonomous parvovirus minute virus of mice is dispensable for encapsidation of progeny single-stranded DNA but is required for infectivity. *J.Virology.* 67:131-141.
- Vassias, I., U. Hazan, Y. Michel, C. Sawa, H. Handa, L. Gouya, and F. Morinet. 1998. Regulation of human B19 parvovirus promoter expression by hGABP (E4TF1) transcription factor. *J Biol Chem.* 273:8287-93.
- Venturoli, S., G. Gallinella, E. Manaresi, G. Gentilomi, M. Musiani, and M. Zerbini. 1998. IgG response to the immunoreactive region of parvovirus B19 nonstructural protein by immunoblot assay with a recombinant antigen. *J Infect Dis.* 178:1826-9.
- Villette Didier, S. Dusko Ehrlich, Benedicte Michel. 1996. Transcription –induced deletions in plasmid vectors: M13 DNA replication as a source of instability. *Mol. Gen.Genet.* 252: 398-403.
- Von Lindern M., Zauner, W., Mellitzer, G., Steinlein, P., Fritsch, G., Huber, K., Lowenberg, B., and Beug, P. 1999. The glucocorticoid receptor cooperates with the erythropoietin receptor and c-Kit to enhance and sustain proliferation of erythroid progenitors in vitro. *Blood;* 94:550-559.
- von Poblitzki, A., C. Gerdes, U. Reischl, H. Wolf, and S. Modrow. 1996. Lymphoproliferative responses after infection with human parvovirus B19. *J Virol.* 70:7327-30.
- von Poblitzki, A., A. Gigler, B. Lang, H. Wolf, and S. Modrow. 1995. Antibodies to parvovirus B19 NS-1 protein in infected individuals. *J Gen Virol.* 76:519-27.
- Watt SM, Gilmore DJ, Davis JM, Clark MR, Waldmann H. 1987. “Cell-surface markers on haemopoietic precursors. Reagents for the isolation and analysis of progenitor cell subpopulations”. *Mol Cell Probes.*; 4: 297-326.
- Weiland, H. T., M. M. Salimans, W. E. Fibbe, P. M. Kluin, and B. J. Cohen. 1989. Prolonged parvovirus B19 infection with severe anaemia in a bone marrow transplant patient [letter]. *Br J Haematol.* 71:300.
- Weiland, H. T., C. Vermey-Keers, M. M. Salimans, G. J. Fleuren, R. A. Verwey, and M. J. Anderson. 1987. Parvovirus B19 associated with fetal abnormality [letter]. *Lancet.* 1:682-3.
- Woernle, C. H., L. J. Anderson, P. Tattersall, and J. M. Davison. 1987. Human parvovirus B19 infection during pregnancy. *J Infect Dis.* 156:17-20.

- Wong, S., M. Momoeda, A. Field, S. Kajigaya, and N. S. Young. 1994. Formation of empty B19 parvovirus capsids by the truncated minor capsid protein. *J Virol.* 68:4690-4.
- Wong Susan, Kevin E. Brown. 2006. "Development of an improved method of detection of infectious parvovirus B19". *Journal of Clinical Virology* Apr; 35(4):407-13.
- Yaegashi, N., H. Shiraishi, T. Takeshita, M. Nakamura, A. Yajima, and K. Sugamura. 1989. Propagation of human parvovirus B19 in primary culture of erythroid lineage cells derived from fetal liver. *J Virol.* 63(6):2422-6.
- Yoshimoto, K., S. Rosenfeld, N. Frickhofen, D. Kennedy, R. Hills, S. Kajigaya, and N. S. Young. 1991. A second neutralizing epitope of B19 parvovirus implicates the spike region in the immune response. *J Virol.* 65:7056-60.
- Young, N., M. Harrison, J. Moore, P. Mortimer, and R. K. Humphries. 1984. Direct demonstration of the human parvovirus in erythroid progenitor cells infected in vitro. *J Clin Invest.* 74:2024-32.
- Yufu, Y., M. Matsumoto, T. Miyamura, J. Nishimura, H. Nawata, and K. Ohshima. 1997. Parvovirus B19-associated haemophagocytic syndrome with lymphadenopathy resembling histiocytic necrotizing lymphadenitis (Kikuchi's disease). *Br J Haematol.* 96:868-71.
- Zadori, Jozsef Szelei, Marie-Claude Lacoste, Yi Li, Sebastien Gariepy, Phillippe Raymond, Marc Allaire, Ivan R. Nabi, and Peter Tijssen. 2001. A viral Phospholipase A2 is required for Parvovirus Infectivity. *Developmental Cell*, Vol. 1, 291-302.
- Zerbini, M., G. A. Gentilomi, G. Gallinella, R. Morandi, S. Calvi, B. Guerra, and M. Musiani. 1998. Intra-uterine parvovirus B19 infection and meconium peritonitis. *Prenat Diagn.* 18:599-606.
- Zerbini, M., M. Musiani, G. Gentilomi, S. Venturoli, G. Gallinella, D. Gibellini, R. Morandi, B. Guerra, L. Bovicelli, and M. La Placa. 1993. Symptomatic parvovirus B19 infection of one fetus in a twin pregnancy. *Clin Infect Dis.* 17:262-3.
- Zerbini, M., M. Musiani, G. Gentilomi, S. Venturoli, G. Gallinella, and R. Morandi. 1996. Comparative evaluation of virological and serological methods in prenatal diagnosis of parvovirus B19 fetal hydrops. *J Clin Microbiol.* 34:603-8.
- Zerbini, M., M. Musiani, S. Venturoli, G. Gallinella, D. Gibellini, G. Gentilomi, and M. La Placa. 1992. Different syndromes associated with B19 parvovirus viraemia in paediatric patients: report of four cases. *Eur J Pediatr.* 151:815-7.

- Zerbini, M., M. Musiani, S. Venturoli, G. Gallinella, D. Gibellini, G. Gentilomi, and M. La Placa. 1990. Rapid screening for B19 parvovirus DNA in clinical specimens with a digoxigenin-labeled DNA hybridization probe. *J Clin Microbiol.* 28:2496-9.
- Zhi Ning, Zoltan Zadori, Kevin E. Brown, and Peter Tijssen. 2004. Construction and sequencing of an infectious clone of the human parvovirus B19. *Virology* 318: 142-152.
- Zhi N., Mills IP, Lu J., Wong S., Filippone C., Brown KE. 2006. Molecular and Functional Analysis of Human Parvovirus B19 Infectious Clone Demonstrates Essential Roles for NS1, VP1 and the 11-kDa Protein in Virus Replication and Infectivity . *Journal of Virology* .
- Zuccheri, G., A. Bergia, G. Gallinella, M. Musiani, and B. Samori. 2001. Scanning force microscopy study on a single-stranded DNA: the genome of parvovirus B19. *Chembiochem.* 2:199-204.
- Zuffi Elisa, Elisabetta Manaresi, Giorgio Gallinella, Giovanna A. Gentilomi, Simona Venturoli, MariaLuisa Zerbini, and Monica Musiani. Identification of an immunodominant Peptide in the Parvovirus B19 VP1 unique region able to elicit a long-lasting immune response in human. *Viral Immunology.* 2001. 14,2: 151-158.

Ringraziamenti

- Parte del lavoro è stato effettuato durante il periodo di permanenza presso il laboratorio Virus Discovery Group dell'NHLBI, NIH, Bethesda, (Maryland USA).
- Per la trasfezione si è utilizzato lo strumento Amaxa presso il laboratorio di Ematologia dell'Università di Bologna.
- L'analisi al microscopio elettronico è stata effettuata in collaborazione con il laboratorio di microscopia elettronica del Dipartimento di Patologia Clinica dell'Università di Bologna.